

# Untersuchung grundlegender Iontentransportmechanismen am Integument von *Lumbricus terrestris*

**SUSANNE G.  
GOEBEL-LAUTH**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Tierphysiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang G. Clauß

**Untersuchung grundlegender Ionentransportmechanismen  
am Integument von *Lumbricus terrestris***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med.vet  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Susanne Gabriele Goebel-Lauth  
Tierärztin aus Frankfurt am Main  
Gießen, 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. W.G. Clauß  
PD Dr. G. Schultheiß

Tag der Disputation: 10. November 2004

***„So kann die Wissenschaft uns lehren,  
auch niedre Tiere hoch zu ehren.“***

***Eugen Roth über den Regenwurm***

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Goebel, S. G., S. Krumm, et al. (2003). "Amiloride-sensitivity and alkali metal cation selectivity of the epithelial sodium channel in lumbricus terrestris (annelida)." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 445(Suppl. 1): S101.

Goebel, S. G., S. Krumm, et al. (2003). Lumbricus terrestris (annelida) ist the phylogenetically lowest terrestrial animal shown to have a typical ENaC. Abstractband der 96. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft. Berlin - Germany: 199.

Goebel, S. G., S. Krumm, et al. (2003). Hormonal regulation of the epithelial sodium channel in the earthworm (lumbricus terrestris, annelida). Abstracts of the Scandinavian Congress of Physiology and Pharmacology. Odense - Denmark: 66.

Goebel, S. G., S. Krumm, et al. (2004). Apical and basolateral  $^{86}\text{Rb}^+$  efflux of earthworm skin preparations. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 447(Suppl. 1): S91.

Goebel, S. G., S. Krumm, et al. (2004). The effect of peptide hormones on  $\text{Na}^+$ -absorption across earthworm integument. Vortrag anlässlich der 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft. Rostock - Germany

Goebel-Lauth S. G., S. Krumm, et al. (2004). Electrophysiological investigations of ion transport mechanisms across earthworm skin. Vortrag anlässlich des „International Symposium on Animal Physiology“. Greifswald - Germany

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....	VI
1 EINLEITUNG .....	1
2 LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1 DER WASSER- UND ELEKTROLYTHAUSHALT DER ANNELIDEN .....	3
2.2 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR OSMOREGULATION BEI DEN HIRUDINEA UND DEN POLYCHAETA .....	4
2.2.1 Hirudinea .....	4
2.2.2 Polychaeta .....	6
2.3 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DES SALZ- UND WASSERHAUSHALTES BEIM REGENWURM (LUMBRICIDAE, OLIGOCHAETA) .....	7
2.3.1 in vivo Untersuchungen am intakten Regenwurm .....	7
2.3.2 Physiologische Untersuchungen einzelner Organsysteme des Regenwurms ....	9
2.3.2.1 Ionentransportprozesse an den Nephridien des Regenwurms .....	9
2.3.2.2 Ionentransportprozesse am Darm des Regenwurms .....	10
2.3.2.3 Ionentransportprozesse an der Haut des Regenwurms .....	11
2.4 REGULATION UND MODULATION DER ELEKTROLYTHOMÖOSTASE BEI DEN ANNELIDEN .....	12
2.5 HISTOLOGIE DER REGENWURMHAUT .....	16
3 MATERIAL UND METHODEN .....	19
3.1 DAS VERSUCHSTIER .....	19
3.1.1 Biologie des Regenwurms .....	19
3.1.1.1 Systematik .....	19
3.1.1.2 Lebensraum .....	20
3.1.1.3 Morphologie .....	20
3.1.2 Tierhaltung .....	21
3.2 AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE .....	21
3.2.1 Präparationstechniken .....	21
3.2.2 Mikroskopische Untersuchungen .....	21
3.2.2.1 verwendete Lösungen .....	22
3.2.2.2 Fixierung des Gewebes .....	22
3.2.2.3 Einbettung des Gewebes .....	22
3.2.2.4 Herstellung der Gefrierschnitte .....	23
3.2.2.5 Histologische Färbungen .....	23
3.2.2.6 Lichtmikroskopie .....	24
3.2.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	24

3.2.3	Transepitheliale elektrophysiologische Untersuchungen .....	25
3.2.3.1	verwendete Lösungen .....	25
3.2.3.2	Messkammer und Perfusionssystem.....	26
3.2.3.3	Elektroden.....	26
3.2.3.4	Voltage-Clamp-Amplifier und Current-Clamp-Messmethode.....	27
3.2.3.5	Aufzeichnung der Daten.....	27
3.2.3.6	Vorzeichenkonvention.....	28
3.2.4	Radioisotopenversuche.....	31
3.2.4.1	verwendete Lösungen.....	31
3.2.4.2	Eingesetzte Isotope .....	31
3.2.4.3	Einheiten der Radioaktivität .....	31
3.2.4.4	Rubidium-Effluxversuche .....	32
3.2.4.5	Szintillationszählung .....	32
3.2.4.6	Berechnung der Efflux-Messdaten .....	33
3.2.5	Statistik .....	34
4	ERGEBNISSE .....	36
4.1	HISTOLOGIE DER REGEWURMHAUT .....	36
4.1.1	Lichtmikroskopische und fluoreszenzoptische Ergebnisse am Leibesschlauch .....	36
4.1.2	Fluoreszenzoptische Ergebnisse am Clitellum .....	38
4.1.3	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse .....	38
4.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER REGENWURMHAUT .....	40
4.2.1	Die Grundparameter in Strom, Widerstand und Spannung .....	40
4.2.2	Charakterisierung des Natriumtransportes .....	42
4.2.2.1	Wirkung von Amilorid und ausgewählten Analoga auf den Natriumstrom .....	42
4.2.2.2	Amilorid-Sensitivität .....	45
4.2.2.3	Benzamil-Sensitivität .....	47
4.2.2.4	Phenamil-Sensitivität.....	49
4.2.2.5	EIPA-Sensitivität .....	51
4.2.2.6	Zusammenfassung .....	53
4.2.3	Selektivität des Gewebes für Alkalimetalle .....	55
4.2.3.1	Versuchsziel .....	55
4.2.3.2	Vorversuche.....	55
4.2.3.3	Selektivitätsversuche .....	56
4.2.3.4	Zusammenfassung: .....	58
4.2.4	Hormonelle Regulation des ENaC .....	59
4.2.5	Charakterisierung des Kaliumtransportes.....	64
4.2.5.1	Verdünnungsreihe Furosemid .....	64
4.2.5.2	Bumetanid.....	65
4.2.5.3	Elimination von apikalem Kalium.....	65
4.2.6	Untersuchung des Kaliumeffluxes .....	66



4.2.6.1	Flammenfotometrische Untersuchungen .....	66
4.2.6.2	Radioisotopenversuche .....	67
4.2.6.3	Elektrophysiologische Untersuchungen mit Hilfe von Kalium- kanalinhibitoren .....	69
5	DISKUSSION .....	71
5.1	PHYSIOLOGIE DES IONENTRANSPORTS ÜBER DAS EPITHEL DES REGENWURMINTEGUMENTS .....	71
5.1.1	Natriumtransport .....	71
5.1.2	Untersuchung des Epithelialen Natriumkanals (ENaC) .....	74
5.1.3	Hormonelle Regulation des Natriumtransports .....	79
5.1.4	Kalium- und Chloridtransport .....	84
5.1.5	Selektivität des Gewebes für Natrium im Vergleich zu Kalium und anderen Alkalimetallen .....	87
5.1.6	Zusammenfassendes Modell der untersuchten Ionentransportmechanismen und Ausblick .....	91
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	93
7	SUMMARY .....	94
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	95
9	ANHANG .....	I
9.1	VERWENDETE LABORGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	I
9.2	VERWENDETE COMPUTER UND ANWENDUNGSPROGRAMME .....	I
9.3	VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	II
9.4	BEZUGSQUELLEN .....	IV
9.5	REZEPTE FÜR DIE HISTOLOGISCHEN FÄRBUNGEN .....	VI
	DANKSAGUNG .....	X

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der verwendeten Ussingkammer. aufgezeichnet. ....	29
<b>Abbildung 2:</b> Die modifizierten Ussingkammern für die elektrophysiologischen Messungen. ....	30
<b>Abbildung 3:</b> Bildschirmdarstellung einer Messung mit dem Chart-Programm. ....	30
<b>Abbildung 4:</b> Für die Effluxmessungen wurden modifizierte Ussingkammern aus Plexiglas mit einem Volumen von 2,5 ml je Kammerhälfte und einer Messfläche von 1cm <sup>2</sup> eingesetzt. ....	33
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung des histologischen Aufbaus des Epithels der Regenwurmhaut im lichtmikroskopischen Bild. ....	37
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der Quer- und Längsmuskulatur des Leibesschlauchs des Regenwurms. ....	37
<b>Abbildung 7:</b> Fluoreszenzoptische Färbung der Clitellumregion des Regenwurms. ....	39
<b>Abbildung 8:</b> Häufigkeitsverteilung der Anfangswerte in der transepithelialen Potentialdifferenz [mV] zu Beginn der einzelnen Experimente (n = 120). ....	41
<b>Abbildung 9:</b> Probit-Plot für den Test auf Normalverteilung am Beispiel der ermittelten Anfangswerte der Potenzialdifferenz. ....	41
<b>Abbildung 10:</b> Die apikale Gabe von 50 µM Amilorid führte stets zu einer Erniedrigung des I <sub>sc</sub> . ....	44
<b>Abbildung 11:</b> Der hemmende Effekt von Amilorid auf den Gesamt-Natriumstrom sank mit fallenden Konzentration. ....	45
<b>Abbildung 12:</b> Verlauf des I <sub>sc</sub> bei sukzessiver Erhöhung der apikalen Amiloridkonzentration auf Regenwurmhaut ....	46
<b>Abbildung 13:</b> Dosis-Wirkungs-Beziehung von Amilorid auf den I <sub>sc</sub> . ....	46
<b>Abbildung 14:</b> Steigende Benzamilkonzentrationen im apikalen PW bewirkten eine schrittweise Depression des I <sub>sc</sub> . ....	48
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich zwischen der Wirkung von Amilorid und seinem Analog Benzamil auf den Natriumstrom. ....	48
<b>Abbildung 16:</b> Der Stromverlauf bei apikaler Gabe von Phenamil auf Regenwurmhaut wies große Parallelen zur der bei Amiloridapplikation auf. ....	49
<b>Abbildung 17:</b> Phenamil hemmte etwa denselben Anteil am Gesamtnatriumstrom wie Amilorid. ....	50
<b>Abbildung 19:</b> Die einzelnen Amiloridanaloga hatten unterschiedlich starke dosisabhängige Wirkungen auf den I <sub>sc</sub> . ....	54
<b>Abbildung 20:</b> Auch in Abwesenheit von NaHCO <sub>3</sub> und KCl im PW reagierte das Gewebe auf die apikale Gabe von Amilorid mit einer vergleichbaren Absenkung des Stroms. ....	56
<b>Abbildung 21:</b> Die Plateauwerte im Strom unter Natriumbedingungen zu Beginn der Experimente (Quadrate) und nach Substitution des Natriums durch andere Alkalimetalle (Kreise). ....	57

<b>Abbildung 22:</b> Nach einer Substitution von NaCl durch LiCl in der apikalen Lösung reagierte das Gewebe sehr viel schwächer auf die Gabe von Amilorid (Doppelpfeile) als vorher.....	58
<b>Abbildung 23:</b> Regenwurmhaut zeigte bei einem Vergleich des amiloridsensitiven Stroms ein Selektivitätsprofil von $\text{Na}^+ \gg \text{Rb}^+ \geq \text{Li}^+ \geq \text{K}^+ \geq \text{Cs}^+$ .....	58
<b>Abbildung 24:</b> Verlauf des $I_{\text{sc}}$ in einem typischen Experiment zur Untersuchung der Wirkung von Peptidhormonen auf $I_{\text{amilo}}$ (Doppelpfeile). ....	59
<b>Abbildung 25:</b> Die durch die Applikation unterschiedlicher Peptidhormone hervorgerufene Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ )..	62
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich der Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ ) bei Gabe von 20munits/ml ( $n = 6$ ) bzw. 40 munits/ml Oxytocin ( $n = 12$ ) für 10 min auf der basolateralen Seite.....	62
<b>Abbildung 27:</b> Vergleich der Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ ) bei Gabe von 2,5 $\mu\text{M}$ 2-tyr-8-lys-conopressin ( $n = 4$ ) bzw. 5 $\mu\text{M}$ ( $n = 8$ ) bzw. 10 $\mu\text{M}$ ( $n = 4$ ) für 10 min auf der basolateralen Seite.....	63
<b>Abbildung 28:</b> Vergleich der Amiloridantwort (Doppelpfeile) in der Stromkurve unter Normalbedingungen und bei basolateraler gemeinsamer Applikation von Annetocin und tocinoic acid.....	63
<b>Abbildung 29:</b> Strukturformeln von Furosemid (A) und Bumetanid (B) .....	64
<b>Abbildung 30:</b> Furosemid bewirkte nur bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{M}$ eine Steigerung im $I_{\text{sc}}$ .....	65
<b>Abbildung 31:</b> Vergleich des apikalen Rubidiumeffluxes, nachdem 30 min lang von beiden Seiten mit $^{86}\text{Rb}$ beladen wurde (graue Rauten, $n = 7$ ) und bei 30-minütiger Beladung nur von der basolateralen Seite her (Quadrate, $n = 4$ ).....	67
<b>Abbildung 32:</b> Vergleich des apikalen Rubidiumeffluxes bei Beladung in isotonem Medium (Dreiecke, $_{\text{Rb}}\text{ERS}$ beidseits) sowie in hypotonem Medium (Rauten, $_{\text{Rb}}\text{PW}$ außen) .....	68
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich des basolateralen Rubidiumeffluxes, nachdem 30 min lang von beiden Seiten mit $^{86}\text{Rb}$ beladen wurde (Rauten, $n = 7$ ), bei 30-minütiger Beladung nur von der apikalen Seite her (Quadrate, $n = 4$ ) sowie nur von der basolateralen Seite her (Dreiecke, $n = 4$ ).....	68
<b>Abbildung 34:</b> apikaler (Rauten) und basolateraler (Quadrate) Efflux nach 30-minütiger Beladung, RR beidseits..	69
<b>Abbildung 35:</b> Die Stromverläufe im Ussingkammerexperiment bei Einsatz von Kaliumkanalinhibitoren.....	70
<b>Abbildung 36:</b> Modell des elektrogenen Natriumtransports modifiziert nach Koefod-Johnsen und Ussing (1958)..	72
<b>Abbildung 37:</b> Phenylalanin (Phe) und Tyrosin (Tyr) sind neutrale Aminosäuren, die über einen Phenylring verfügen. Sie unterscheiden sich lediglich in einer Hydroxylgruppe. ....	81
<b>Abbildung 38:</b> Modell der Kaliumtransportmechanismen der Epithelzellen der Regenwurmhaut.....	86
<b>Abbildung 39:</b> Zusammenfassendes Modell der grundlegenden Ionentransportmechanismen über das Integument von <i>Lumbricus terrestris</i> .....	92

## Verzeichnis der Abkürzungen

Å	Angström, Größeneinheit für Atome, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
Abb.	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Arg	Arginin
Ba, $\text{Ba}^{2+}$ , $\text{BaCl}_2$	Barium, Bariumion, Bariumchlorid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca, $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{CaCl}_2$	Calcium = Kalzium, Kalziumion, Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cl, $\text{Cl}^-$	Chlor, Chloridion
cm, $\text{cm}^2$	Zentimeter, Quadratzentimeter
cpm	counts per minute
Cs, $\text{Cs}^+$ , $\text{CsCl}$	Cäsium = Cesium, Cäsiumion, Cäsiumchlorid
DMSO	Diethylsulfoxid
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
ERS, $\text{RbERS}$	Earthworm Ringer's Solution = Regenwurm-Ringerlösung, Regenwurm-Ringerlösung mit $\text{RbCl}$ statt $\text{KCl}$
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-iso-thio-cyanat
FMRF	Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin
g	Gramm
H33342	ein Farbstoff der Firma Hoechst
H.E.	Hämatoxilin-Eosin (-Färbung)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfoic acid]
$\text{HNO}_3$	Salpetersäure
$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	Wasser, bidestilliertes Wasser
$I_{\text{sc}}$	Kurzschlussstrom
$I_{\text{amilo}}$	amiloridsensitiver Strom

K, K <sup>+</sup> , KCl, <sup>42</sup> K	Kalium, Kaliumion, Kaliumchlorid, ein radioaktives Isotop des Kaliums
l	Liter
Li, Li <sup>+</sup> , LiCl	Lithium, Lithiumion, Lithiumchlorid
Lys	Lysin
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
Met	Methionin
Mg, Mg <sup>2+</sup> , MgCl <sub>2</sub>	Magnesium, Magnesiumion, Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
M, mM, μM	molar (=mmol/l), millimolar, micromolar
mmol	Millimol
mU	Milliunit
mV	Millivolt (Einheit der transepithelialen Potenzialdifferenz)
n	Stichprobenumfang
Na, Na <sup>+</sup> , NaCl	Natrium, Natriumion, Natriumchlorid = Kochsalz
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na/K/ATPase	Natrium/Kalium-Pumpe
Na/K/2Cl-Cotransporter	Natrium/Kalium/2Chlorid-Cotransporter
NaOH	Natronlauge
o.ä.	oder ähnliche/s
osmol	Einheit der Osmolarität
PC	personal computer
PD	Potenzialdifferenz
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration (p = negativer Potenzexponent)
Phe	Phenylalanin
Pos.	Position

PW, $R_b$ PW	(artificial) Pond-Water = künstliches “Teichwasser”, Pond-Water mit RbCl statt KCl
$R_t$	transepithelialer Widerstand (R= Resistance)
Rb, $^{86}\text{Rb}$	Rubidium, ein radioaktives Isotop des Rubidiums
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TMA-Cl	Tetramethylammoniumchlorid
Tyr	Tyrosin
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
uvm	und viele/s mehr
V	Volt
vgl.	vergleiche
$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	Mikro-
$\mu\text{A}$	Mikroampère (Einheit des transepithelialen Stroms)
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\Omega$ , k $\Omega$	Ohm, Kiloohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)

# 1 Einleitung

Die Erforschung von Regulationsmechanismen des Ionentransports über biologische Membranen ist eine der Säulen der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung, da die Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase der Zellen und der Körperflüssigkeiten die Grundvoraussetzung physiologischer Prozesse bei allen Lebewesen darstellt. Eine bewährte Methode ist dabei die schrittweise Erforschung komplizierter Mechanismen an verhältnismäßig einfachen Modellorganismen, was im Weiteren zum Verständnis von Prozessen komplexerer Systeme beitragen soll.

Hans H. Ussing (1911-2000) wurde berühmt durch seine electrophysiologischen Experimente an der Froschhaut. Gegenüber menschlichen Zellverbänden bot dieses Gewebe eines poikilothermen Vertebraten den Vorteil einer größeren Temperaturtoleranz. Auch die hohe Stabilität und leichte Verfügbarkeit der Froschhaut machten sie zu einem weit verbreiteten Modellgewebe für physiologische Studien. Mit Hilfe einer eigens angefertigten Apparatur, der so genannten „Ussingkammer“, gelang Ussing die Entwicklung eines Modells des elektrogenen Ionentransports über die zwei funktionell getrennten Membranen von Epithelzellen. Die von ihm entwickelten Techniken und Hypothesen haben bis heute nahezu uneingeschränkt ihren Platz in der Physiologie behalten.

Als noch „einfachere“ Modellorganismen für bestimmte Fragestellungen bieten sich jedoch Invertebraten an. So ist z.B. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nicht erst seit der Vergabe des Nobelpreises für Medizin/Physiologie an Edward B. Lewis, Christiane Nusslein-Volhard und Eric F. Wieschaus im Jahre 1995 ein weltweit geschätztes Modelltier in der Vererbungslehre. Gründe hierfür sind neben der einfachen Handhabung und Haltung der Insekten auch Tierschutz- und Kostenfragen. Diese Vorteile bietet auch der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Auch seine entwicklungs- bzw. molekularbiologische Erforschung mündete im Jahr 2002 in der Vergabe des Nobelpreises für Medizin/Physiologie an Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston.

Aus dem phylogenetisch zwischen den eben erwähnten Nematoden und den Insekten einzuordnenden Tierstamm der Ringelwürmer (Annelida) ist der allgemein wohl bekannteste Vertreter der Polychaet *Nereis*, welcher als Modelltier der Entwicklungsbiologie in keinem Lehrbuch der Zoologie fehlt. Vergleichsweise wenig ist bisher hingegen über zellphysiologische Prozesse wie Ionentransportmechanismen über die Zellen der meisten Anneliden bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, grundlegende Ionentransportmechanismen über die Haut des Regenwurms als Vertreter der Oligochaeten (Annelida) zu untersuchen. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass der Regenwurm vermutlich über einen so genannten Epithelialen Natriumkanal (ENaC) verfügt (Krumm 2002). Dieser Ionenkanal wurde von Ussing (s.o.) an der Froschhaut funktionell beschrieben, und heute weiß man, dass er typisch für sehr viele andere dichte Epithelien wie z.B. das

Tubulussystem der Vertebratenniere ist. Aufgrund der zentralen Funktion im Rahmen der Natriumabsorption spielt der ENaC eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasser- und Elektrolythomöostase aller Vertebraten und vieler Invertebraten. Defekte in diesem System äußern sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern bei Mensch und Tier. So führen z.B. bestimmte Genmutationen zum so genannten Liddle's Syndrom, einer erblichen Bluthochdruckerkrankung des Menschen. Daher hat die Erforschung des ENaC im Rahmen der Grundlagenforschung ihren Platz vorwiegend für die Humanmedizin. Nun stellt sich beim Mensch aber das Problem, dass Ionenkanäle bei Vertebraten im Allgemeinen hoch reguliert sind. U. a. spielen Peptidhormone und Steroidhormone eine Rolle, und viele Interaktionen sind zu berücksichtigen.

Aus diesem Grunde sind Modelltiere interessant, bei denen der ENaC vorkommt, die aber aufgrund Ihrer phylogenetischen Stellung im Tierreich noch nicht über so viele Regulationsmechanismen verfügen. Erste strukturelle Analoge zum ENaC des Menschen finden sich beim Nematoden *C. elegans*, doch offensichtlich sind die Anneliden der erste Tierstamm, in dem der Ionenkanal seine typische Funktion ausübt. Gleichzeitig kommt beim Regenwurm der beim Vertebraten wichtigste Regulationsfaktor des ENaC, das Steroidhormon Aldosteron, nicht vor. Damit ist er sozusagen ein natürlicher Aldosteron knock-out Organismus, was ihn besonders interessant für eine schrittweise Aufklärung bestimmter Fragestellungen den ENaC betreffend macht.

Aus diesen Gründen sollen im Rahmen dieser Arbeit mit histologischen Methoden, mit elektrophysiologischen Messungen in der Ussingkammer sowie mit Radioisotopentechniken folgende Fragestellungen näher untersucht werden:

- Wie lässt sich das untersuchte Gewebe morphologisch charakterisieren?
- Welche Ionenkanäle, -transporter oder -pumpen lassen sich funktionell in der apikalen bzw. basolateralen Membran der Epithelzellen nachweisen?
- Wie sind die pharmakokinetischen Eigenschaften von Amilorid am Epithel der Regenwurmhaut?
- Wie selektiv ist das Gewebe hinsichtlich der Resorption verschiedener monovalenter Kationen?
- Wie wird der amiloridsensitive Strom speziell durch Peptidhormone reguliert/beeinflusst?



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Wasser- und Elektrolythaushalt der Anneliden

Der Tierstamm der Anneliden (Ringelwürmer) umfasst die unterschiedlichsten Arten, welche ein weites Spektrum an Lebensräumen bewohnen. Dabei sehen sich marine Vertreter (z.B. *Nereis*, *Arenicola*) mit ganz anderen osmotischen Bedingungen konfrontiert als limnische (z.B. *Hirudo*, *Tubifex*) oder gar terrestrische Arten (z.B. *Lumbricus*, *Eisenia*). Alle müssen aber über Mechanismen zur Kontrolle der Osmolarität ihrer Körperflüssigkeiten verfügen, denn die kann je nach Lebensraum hypo- oder hyperten gegenüber der Umgebung sein. Hierbei kommen verschiedene Verhaltensstrategien sowie sonstige physiologische Prozesse zur Aufrechterhaltung der Salz- und Wasserbalance zum Einsatz (Zerbst-Boroffka 1984). Dabei ist zwischen Mechanismen zur Volumenkontrolle und zur Osmoregulation zu unterscheiden. In der Praxis werden diese Mechanismen mit Hilfe von Isotopenflux-Untersuchungen sowie mit elektrophysiologischen Techniken am intakten Tier sowie an Gewebspräparationen (z.B. der Haut) untersucht.

Prinzipiell kann die Osmoregulation bei den Invertebraten ebenso wie bei Vertebraten über den Darm, die Nieren (Nephridien) oder die Haut geschehen. An allen diesen Orten beruht der Prozess der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase des Gesamtorganismus letztendlich auf dem Vorhandensein und der Kontrolle von Ionentransportmechanismen der einzelnen Epithelzellen. Vor allem der Transport von Natrium und Chlorid ist hier von Bedeutung, aber auch andere Ionen wie Kalzium und Kalium spielen eine Rolle. In sehr dichten Epithelien, wie dem Integument der Anneliden, erfolgt z.B. die Absorption von Natrium nicht parazellulär sondern durch die Zellen hindurch mit Hilfe spezieller Ionenkanäle, -transporter und -pumpen.

Eine erste umfangreiche Zusammenfassung zum Salz- und Wasserhaushalt der verschiedenen Anneliden gab Oglesby (Oglesby 1978). Die nächsten Abschnitte dieses Kapitels sollen darüber hinaus Auskunft über physiologische Untersuchungen zu diesem Forschungsgebiet bis zum heutigen Tage geben. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf Experimenten am Regenwurm, da die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zum einen auf den bisherigen Erkenntnissen aufbauen und auch in der Diskussion mit diesen verglichen werden sollen.

## 2.2 Bisherige Untersuchungen zur Osmoregulation bei den Hirudinea und den Polychaeta

### 2.2.1 Hirudinea

Mit den Mechanismen der Osmoregulation beim limnisch lebenden Blutegel (*Hirudo medicinalis*) beschäftigten sich in den letzten 40 Jahren vorwiegend zwei Arbeitsgruppen. Die Gruppe um Zerbst-Boroffka untersucht seit den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts vor allem die Nephridienfunktion der Anneliden, wohingegen der Aspekt des elektrogenen Natriumtransports über das Integument der Ringelwürmer erst in den letzten 15 Jahren eingehender von Clauss et. al. untersucht wurde [reviews: (Clauss 2001; Schnizler, Krumm et al. 2002)].

Die Bildung von Urin über die Nephridien als ein bedeutender Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Körperelektrolythomöostase ist für den Blutegel vor allem in zwei Situationen essentiell; a) bei einer Veränderung des Salzgehalts des ihn umgebenden Wassers (z.B. nach Einwanderung in Brackwassergebiete) bzw. b) nach einer (deutlich hyperosmolaren) Blutmahlzeit.

In ersten Arbeiten untersuchte Boroffka (Boroffka 1968) die osmotische Konzentration und ionale Zusammensetzung von Blut und Endharn sowie den Harnfluss und die Körpermasse der Egel in den verschiedenen Phasen der Anpassung der Tiere an veränderte Salzkonzentrationen der Umgebung. Der Blutegel hielt seine Blutosmolarität in hypotonem Aussenmedium stets über der der Umgebung. Der konstante Wassereinstrom wurde durch die Produktion eines hypotonen Urins kompensiert, und somit wurde der Hauptmechanismus der Osmoregulation als „renale“ (bzw. nephridiale) Volumenregulation beschrieben.

In weiteren Arbeiten beschäftigte sich die Autorin eingehend mit der Ultrastruktur und der Funktion der Nephridien des Blutegels (Zerbst-Boroffka 1975; Zerbst-Boroffka, Wenning et al. 1982; Zerbst-Boroffka 1987). Die Bildung des Primarharns beruht laut dieser Studien auf der Sekretion einer natrium-, kalium- und chloridreichen Flüssigkeit in das so genannte Canaliculus-System, welches in den Zentralkanal mündet, wo dann gelöste Stoffe resorbiert werden und so die Konzentration des Endharns eingestellt werden kann. So steigt z.B. nach einer Blutmahlzeit des Tieres die Diurese und Salzexkretion stark an, wohingegen der Egel im hypotonen Aussenmedium einen deutlich niederosmolaren Urin produziert.

Zusätzlich zu einer reinen Messung von Ionenkonzentrationen in Körperflüssigkeiten und Studien am intakten Tier entwickelte die Arbeitsgruppe eine isolierte Nephridienpräparation (Zerbst-Boroffka and Wenning 1986), mit der detailliertere Untersuchungen der Iontentransportmechanismen möglich waren. So beschrieb sie einen Natrium/Kalium/2-Chlorid-Cotransporter in der basolateralen Membran der Canaliculus-

Zellen des Nephridiums aufgrund der Sensitivität dieses Transporters gegenüber dem Diuretikum Furosemid. Ouabain (ein Inhibitor der Natrium/Kalium-ATPase) senkte den Urinfluss, wohingegen Amilorid (ein Inhibitor Epithelialer Natriumkanäle und des Natrium/Protonen-Austauschers) an diesem Gewebe keinen Effekt hatte.

In einem Modell des Ionentransports über die Canaliculus-Zellen (beruhend auf Mikropunktions- und Substitutionsversuchen sowie elektrophysiologischen Untersuchungen und pharmakologischen Studien *in vivo* sowie an isolierten Nephridien) wurden eine basolaterale Natrium/Kalium-Pumpe, ein basolateraler Natrium/Kalium/2-Chlorid-Cotransporter, basolaterale Kaliumkanäle und eine lumenwärts gerichtete Leitfähigkeit für Chlorid (ev. als energieabhängiger Cl/K-Cotransport) sowie eine eventuelle parazelluläre, passive Natriumsekretion beschrieben. Dabei fördert die apikale Chloridleitfähigkeit das lumen-negative Potenzial, welches die Triebkraft für einen transzellulären Kalium- und einen parazellulären Natriumtransport in serosaler Richtung darstellen kann. Die Natrium/Kalium-Pumpe garantiert die Aufrechterhaltung eines Natriumgradienten, der für den Natrium/Kalium/2-Chlorid-Cotransport notwendig ist. Der Endharn wird letztendlich durch subsequente Reabsorption von Ionen entlang des Zentralkanals im Nephridium gebildet (Zerbst-Boroffka, Bazin et al. 1997).

Es wurden auch zusätzliche Versuche zur Osmoregulation des Blutegels unter hypoxischen sowie unter hyperosmotischen Bedingungen beschrieben. So war während einer Hypoxie ein Anstieg organischer Säuren im Blut zu verzeichnen (Hildebrandt and Zerbst-Boroffka 1992). Dieser Anstieg ging mit einer Erniedrigung der Natrium- und Chloridkonzentration einher. Offensichtlich handelt es sich um einen Mechanismus, der verhindert, dass die Akkumulation nicht-ausscheidbarer Osmolyte unter hypoxischen Bedingungen die Blutosmolarität zu stark aus dem Gleichgewicht bringt. Das könnte ansonsten einen unkontrollierbaren Wassereinstrom über die Haut zur Folge haben. Aber nicht nur auf Hypoxie reagierte der Blutegel mit einem Anstieg kurzkettiger Carbonsäuren. Auch durch hyperosmotischen Stress stieg der Anteil dieser organischen Säuren im Muskelgewebe der Tiere schnell an, was auf einer Umstellung des Stoffwechsels zu beruhen schien (Nieczej and Zerbst-Boroffka 1993). So war vermutlich die deutliche Steigerung der Muskelaktivität der Egel unter hyperosmotischen Bedingungen für den Anstieg an Laktat verantwortlich. Als Reaktion erfolgte eine Hyporegulation der Chloridkonzentration, ein Effekt vergleichbar mit den Reaktionen auf hypoxische Bedingungen.

Elektrophysiologische Untersuchungen an der Haut von *Hirudo medicinalis* zeigten, dass dieses Epithel sehr dicht war ( $\sim 1 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ ) (Weber, Dannenmaier et al. 1993). Das implizierte, dass der Transport von Ionen auch über dieses Gewebe vorwiegend über Ionenkanäle, Carrier, Ionentransporter o.ä. erfolgt. In langjährigen Untersuchungen (Weber, Blank et al. 1995; Milde, Clauss et al. 1996; Schnizler, Krumm et al. 2002; Schnizler and Clauss 2003) wurde ein Modell von Ionentransportprozessen über die Epithelzellen des Integuments von *Hirudo* ermittelt, welches u.a. eine amiloridsensitive Natriumabsorption beschreibt, die durch Kalziumionen in der apikalen Lösung abgeschwächt und durch Gadolinum stimuliert wurde. Aufgrund der spezifischen Inhibierbarkeit des Natriumstroms durch das Diuretikum Amilorid wurde die Existenz eines Epithelialen Natriumkanals

(ENaC) oder verwandten Ionenkanals in diesem Invertebratengewebe vermutet. Als treibende Kraft für eine Natriumabsorption über den amiloridsensitiven Natriumkanal (apikale Membran) wurde eine basolateral lokalisierte Natrium/Kalium-Pumpe identifiziert. Interessanterweise war der Natriumtransport zum einen von externen Faktoren, wie der Natriumkonzentration im umgebenden Medium abhängig, aber auch von endogenen Substanzen. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) stimulierte die amiloridsensitive Natriumaufnahme durch eine Erhöhung der Anzahl funktioneller Kanäle in der Membran (Weber, Dannenmaier et al. 1993; Weber, Blank et al. 1995). Das Gewebe erwies sich als sehr selektiv für Natrium über andere Alkalimetalle. Eine spannungsabhängige Kationenleitfähigkeit der basolateralen Membran wurde gefunden (Schnizler and Clauss 1998), konnte aber nicht im Detail erklärt werden. Es handelte sich um einen für Epithelien eher seltenen Befund. Die Haut des Blutegels wurde auch als Modellgewebe hinsichtlich des Effekts von Schwermetallen und Pestiziden auf Epithelien eingesetzt (Milde, Clauss et al. 1996). Dabei inhibierten vor allem Blei und Quecksilber den amiloridsensitiven Natriumtransport schon in sehr niedrigen Konzentrationen, was das Gewebe also Bioindikator interessant für ökotoxikologische Studien macht.

### 2.2.2 Polychaeta

Marine bzw. semimarine Anneliden wie *Nereis*-Arten (Polychaeta) transportieren über ihre Haut ebenfalls Ionen wie Natrium und Chlorid, doch das Medium, in dem sie leben, ist viel konzentrierter als z.B. bei Frischwasseranneliden. In stark salzhaltigem Wasser haben sie nicht so sehr mit einem Verlust von Salzen sondern primär mit einem Verlust von Körperwasser zu rechnen. Um dem entgegenzuwirken, halten sie ihre Körperflüssigkeiten gegenüber dem Medium leicht hyperton (Oglesby 1978). Dieser Mechanismus ist z. T. in sehr weiten Konzentrationsbereichen des Mediums möglich. Er beruht auf einer Reduzierung der Permeabilität der Haut gegenüber Ionen und der Fähigkeit, Natrium und Chlorid entgegen dem chemischen Gradienten zu konzentrieren.

Speziell mit dem Austausch von Natrium und Chlorid bei niedrigen Salzkonzentrationen des Mediums befasste sich Smith (Smith 1970; Smith 1970a; Smith 1976) am Beispiel von *Nereis diversicolor*, einem Brackwasserbewohner. Der Autor beschreibt einen hochaffinen Natrium-Aufnahmemechanismus über die Haut mit einer halbmaximalen Aufnahmerate bei einer externen Natriumkonzentration von 8-10 mM und einer Sättigung bei 40-50 mM. Bei einer Außenkonzentration von mehr als 350 mM Natrium war der Transport passiv und somit proportional zur Natriumkonzentration. Der aktive Chloridtransport erreichte eine Sättigung bei 50-60 mM und war demnach vergleichbar mit dem Natriumtransport. Die Permeabilität der Haut von Natrium und Chlorid war reduziert bei sehr geringen Salzkonzentrationen im Medium, was ein Ausströmen von Ionen ihrem chemischen Gradienten folgend verhinderte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Frischwasseranneliden wie *Hirudo* und Brackwasseranneliden wie *Nereis* in ihrer Fähigkeit, Natrium und Chlorid gegen Konzentrationsgradienten über die Haut aufzunehmen, nicht grundsätzlich unterscheiden, auch wenn sie in Medien mit ganz unterschiedlichen Salzgehalten leben. In den nächsten Abschnitten soll demgegenüber speziell auf die Ionentransportmechanismen von terrestrischen Anneliden wie dem Regenwurm eingegangen werden, da dieser der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Modellorganismus war.

## **2.3 Bisherige Untersuchungen zur Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes beim Regenwurm (Lumbricidae, Oligochaeta)**

### **2.3.1 *in vivo* Untersuchungen am intakten Regenwurm**

Im zweiten Drittel des letzten Jahrhunderts war der Regenwurm insgesamt ein sehr populäres Versuchstier. Neben intensiven Studien zur Morphologie und Histologie (vgl. Kap. 2.5) und zur Verbreitung der einzelnen Arten beschäftigten sich verschiedene Gruppen auch mit dem Wasserhaushalt der Würmer. Roots (Roots 1956) untersuchte das Verhalten von 6 Regenwurmarten aus den Gattungen *Allolobophora*, *Dendrobena* und *Lumbricus* hinsichtlich ihres bevorzugten Lebensraumes und ihrer Toleranz gegenüber Austrocknung zum Einen und einem Leben unter Wasser zum Anderen. Sie kam zu dem Ergebnis, dass der Wassergehalt der Tiere bei Haltung auf feuchtem Filterpapier etwa 80-85 % der Körpermasse ausmachte, wobei ein Verlust von bis zu 60 % der Körpermasse (entsprechend ca. 70 % des Wassergehaltes) noch mit dem Überleben vereinbar war. *Lumbricus* konnte dabei innerhalb von 24 Stunden 50 % seiner Körpermasse verlieren, *Allolobophora* sogar innerhalb von 3 Stunden.

Auf der anderen Seite waren alle Arten in der Lage, über viele Wochen hinweg komplett unter Wasser zu überleben. Dabei wurde den Tieren entweder eine Erdschicht am Grund des Beckens angeboten, oder es handelte sich um belüftetes Leitungswasser alleine. Beide Lebensräume wurden von den Tieren problemlos verkraftet, und sogar aus Kokons schlüpften und überlebten unter Wasser junge Würmer. Die Fähigkeit, in belüftetem Wasser zu überleben wurde allerdings schon mehr als 80 Jahre vor den Experimenten von Roots erkannt (Perrier 1874). Nichtsdestotrotz vermieden vor allem die *Dendrobena*- und *Lumbricus*-Arten allzufeuchte Lebensräume, wenn Alternativen vorhanden waren.

Unter anderem auf diese Studien nahm Carley (Carley 1978) Bezug und ermittelte, dass Regenwürmer, die in feuchter Erde gehalten wurden, nicht maximal hydriert waren. Um komplett zu hydrieren, wurden die Tiere für einige Tage in Teichwasser gehalten. Wurden sie danach in einer Atmosphäre mit 100 % relativer Luftfeuchte gehalten, so verloren sie innerhalb von 24 Stunden etwa 20 % an Gewicht, welches daraufhin für viele Tage

konstant blieb. Bei 70-80 % Luftfeuchte verloren die Tiere innerhalb eines Tages mehr als die Hälfte ihrer Körpermasse und nur wenige überlebten.

Carley untersuchte zusätzlich den osmotischen Druck der Coelomflüssigkeit. Der stieg um 4 mosmol/l mit jedem Prozent an Gewichtsverlust der Tiere und konnte somit nicht kontrolliert werden. Allerdings tolerierten die Tiere einen Anstieg der Osmolarität der Coelomflüssigkeit in weiten Bereichen. Evolutionsbiologisch ist anzunehmen, dass frühe Oligochaeten im Schlamm von Tümpeln lebten, und dass die Fähigkeit zur Änderung der Permeabilität der Haut eine Anpassung an trockenere, terrestrische Lebensräume erlaubte.

Speziell mit der ionalen Zusammensetzung und Balance der Coelomflüssigkeit des Regenwurms beschäftigte sich bereits eine japanische Arbeitsgruppe (Kamemoto, E. et al. 1962). Man fand heraus, dass die Konzentrationen der Kationen Natrium, Kalium und Kalzium signifikant höher im Blut der Tiere als in der Coelomflüssigkeit waren, wohingegen Chlorid in beiden Körperflüssigkeiten in gleichen Konzentrationen vorkam. Die Natriumkonzentration der Körperflüssigkeiten wurde dabei über der des umgebenden Mediums gehalten, was auf das Vorhandensein spezieller Regulationsmechanismen hindeutete.

Diese untersuchte Dietz (Dietz and Alvarado 1970) an Regenwürmern, die mindestens eine Woche lang in belüftetem so genanntem künstlichen Teichwasser equilibriert wurden. Er untersuchte neben der ionalen Zusammensetzung der Coelomflüssigkeit auch die in Kropf und Rektum. Die Kropfflüssigkeit war dabei isoosmotisch zur der das Coeloms, wohingegen die Rektalflüssigkeit stärker verdünnt war. Die Autoren kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Tiere ein hyperionisches Gleichgewicht aufrechterhielten, wenn sie einer hypoosmotischen Umgebung ausgesetzt waren. Sie stellten fest, dass Natrium und Chlorid unabhängig voneinander über die Haut absorbiert wurden, und zwar gegen einen elektrochemischen Gradienten. Der Natriuminflux war dabei von der Natriumkonzentration des Außenmediums abhängig, und bei niedrigem Salzangebot stieg die Aufnahme von Natrium und Chlorid. Speziell mit dem Chloridtransport beschäftigte sich Dietz später noch einmal eingehender (Dietz 1974). Er fand heraus, dass der Chloridtransport aus der Lösung in den intakten Wurm vorwiegend über die Haut erfolgte, durch Acetazolamid inhibierbar war und somit eventuell im Austausch gegen endogenes Bicarbonat erfolgte. Die Kinetik des Chloridtransports erbrachte eine etwas höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) als beim Natrium und die Affinitätskonstante war vergleichbar mit limnischen Tieren. Diese Ergebnisse basierten auf Radioisotopen-Fluxmessungen.

Richards (Richards and Arme 1979) zeigte mit Hilfe von radioaktiv markierten Aminosäuren, dass deren Aufnahme über die Haut des Regenwurms ebenfalls unabhängig von Natrium erfolgte. Das stand im Gegensatz zu den Ergebnissen bei polychaeten Anneliden, was aber eventuell auf die grundsätzlich verschiedenen Lebensräume zurückzuführen ist (marin – terrestrisch).

Dietz et. al. beschrieben in der Publikation von 1970 auch erstmals elektrophysiologische Experimente am Regenwurm. Sie bestimmten die transepitheliale Potenzialdifferenz *in*

*vivo* am ganzen Tier und fanden, dass das Wurminnere elektronegativ gegenüber der Badlösung war, was im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Blutegel stand. Die Autoren diskutierten bereits die Rolle von epithelialen Ionenpumpen zur Modifikation des Elektrolytgehaltes der Körperflüssigkeiten sowie den Einfluss von neuroendokrinen Mechanismen zu deren Kontrolle.

Genau diese Aspekte werden in der hier vorliegenden Arbeit mit erweiterten elektrophysiologischen Methoden aufgegriffen. Im Gegensatz zu einer reinen Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz, konnten hier auch der elektrische Widerstand und der Strom bestimmt werden. Dabei wurde nicht mit intakten Tieren gearbeitet, sondern mit Teilstücken der Rückenhaut. Wie bereits erwähnt, ist die Haut jedoch nicht der einzige Ort, an dem Elektrolyttransporte stattfinden. Verschiedene Autoren haben sich eingehender mit weiteren Organsystemen beschäftigt, welche im Folgenden angesprochen werden.

## **2.3.2 Physiologische Untersuchungen einzelner Organsysteme des Regenwurms**

### **2.3.2.1 Ionentransportprozesse an den Nephridien des Regenwurms**

Wie bei allen Tieren sind die Nieren auch in diesem Tierstamm von entscheidender Bedeutung zur Kontrolle des Elektrolythaushalts des Gesamtorganismus. Ebenso wie andere Anneliden verfügt der Regenwurm über Metanephridien. Deren Morphologie und Funktion ist im Detail beschrieben (Boroffka 1965; Zerbst-Boroffka 1975). Jedes Segment des Regenwurmkörpers (mit Ausnahme der vordersten) hat ein Metanephridienpaar. Jedes Nephridium beginnt mit einem Wimpertrichter, der offen in die Leibeshöhle mündet. Die dort befindliche Coelomflüssigkeit kann als Primärharn angesehen werden und wird aus dem Blut filtriert. Beide Flüssigkeiten haben einen vergleichbaren osmotischen Druck. Die Coelomflüssigkeit hat einen osmotischen Druck von zunächst etwa 182 mosmol/l und gelangt über den sogenannten Halskanal, der durch das Dissepiment führt, in den Cilienkanal. Der öffnet sich in den weiten Kanal, welchen man weiter in Ampulle, proximalen, mittleren und distalen Teil untergliedert. Letzterer mündet in die Blase. Bis er hier angekommen, ist der Urin stark hypoton geworden (ca. 34 mosmol/l). Das kommt dadurch zustande, dass im Kanalsystem Salze resorbiert werden, wohingegen das Epithel hier impermeabel gegenüber Wasser ist.

Der Natriumtransport im proximalen Teil des weiten Kanals stellte sich dabei als aktiv und der Chloridtransport als passiv heraus (Boroffka 1965). Diese Ergebnisse beruhten auf der Ermittlung der transepithelialen und der transtubulären Potenzialdifferenz und der hierauf basierenden Berechnung der elektrochemischen Potenzialdifferenz im Gleichgewichtszustand (d.h. der unidirektionale Natriumausstrom ist gleich dem Einstrom). Die Potenzialdifferenz wurde mit Hilfe der Mikropunktionstechnik elektrophysiologisch bestimmt.

### 2.3.2.2 Ionentransportprozesse am Darm des Regenwurms

Elektrophysiologische Untersuchungen im voltage-clamp-Verfahren am Vorderdarm des Regenwurms ergaben eine transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) von 1,9 mV (Lumen-negativ) sowie einen Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) von 0,35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Sylvia and Boettiger 1967). Dabei war der Natriumtransport hauptsächlich verantwortlich für die Generierung der PD. Die Ausgangswerte erwiesen sich als beeinflussbar durch unterschiedliche ionale Zusammensetzungen der Badlösungen, des pHs sowie bei Einsatz von chemischen Substanzen. So sanken PD und  $I_{sc}$  irreversibel auf 0, wenn das Gewebe mit KCN in Berührung kam. Je 10  $\mu\text{M}$  Ouabain oder Dinitrophenol führten bei mucosaler Gabe zu einem teilweise reversiblen Absinken von PD und  $I_{sc}$ , wohingegen die serosale Applikation die beiden Parameter irreversibel auf 0 senkte. PH-Veränderungen der Lösungen beeinflussten sowohl die Amplitude als auch das Vorzeichen der transepithelialen Potenzialdifferenz. Als Ausblick diskutierte Sylvia die Notwendigkeit weitere Untersuchungen, z.B. mit Hilfe von Radioisotopen.

Genau solche Versuche wurden ein Jahrzehnt später von Cornell veröffentlicht (Cornell 1979; Cornell 1982). Er bestätigte die Ergebnisse von Sylvia und bestimmte zusätzlich unidirektionale Natrium- und Chlorid-Fluxe sowie die PD und den  $I_{sc}$  über den ganzen Darm des Regenwurms. Auf seinen Ergebnissen basierend unterteilte er den Darm in mehrere Regionen, die ähnlich wie die anatomisch zu unterscheidenden Bezirke verteilt waren. Die anterioren Regionen zeichneten sich gegenüber dem Rektum durch deutlich niedrigere Potenzialdifferenzen aus. Der gemessene Kurzschlussstrom war im Bereich vor Beginn des Rektums am höchsten, und auch die gemessenen Natrium- und Chloridfluxe waren hier besonders ausgeprägt. In diesem Bereich war der Transport beider Ionen von serosal nach mukosal gerichtet, wohingegen ein Stück weiter anterior beide Ionen aus dem Lumen resorbiert wurden. Die Anfangskonzentration von NaCl von 50-80 mM fiel bis zum Rektum hin auf 5-20 mM ab, was ähnlich wie im Kanalsystem des Nephridiums für einen salzkonservierenden Prozess in insgesamt posteriorer Richtung sprach. Die Tatsache, dass 100  $\mu\text{M}$  Amilorid im Enddarmbereich eine reversible Hemmung von Strom und Potenzialdifferenz bei gleichzeitiger Steigerung des Gewebswiderstandes bewirkte und dabei den Natriumflux von mucosal nach serosal hemmte, sprach für das Vorkommen eines amiloridsensitiven Natriumtransportsystems in diesem Teil des Darms. Insgesamt zeigten die Versuche einen aktiven Transport von Natrium in der hinteren Hälfte des Darmkanals, wohingegen Chlorid in den meisten Darmregionen passiv resorbiert und nur in einem bestimmten Teil aktiv sezerniert wurde. Auffällig waren insgesamt die Gemeinsamkeiten zum Vertebratendarm. Auch hier dient in der Regel der letzte Darmabschnitt der Salzresorption.



### 2.3.2.3 Ionentransportprozesse an der Haut des Regenwurms

Wie bereits beschrieben, ist gerade die Haut ein besonders wichtiger Ort der Wasser- und Salzaufnahme für den Regenwurm. NaCl wird über die Haut auch dann resorbiert, wenn nur Spuren davon im Medium vorhanden sind (Boroffka 1965), und es stellte sich heraus, dass die Netto-Wasseraufnahme der Würmer beim Verbringen aus der Erde in Wasser durch eine Ligation des anterioren und des posterioren Körperendes nicht beeinflusst wurde (Maluf 1939).

Tercafs (Tercafs 1965) beschreibt erste Versuche an der Regenwurmhaut mit der Ussingkammer-Technik, wobei er elektrophysiologische Messungen mit Radioisotopenversuchen koppelte. Sein Modell der Ionentransportprozesse am Epithel der Regenwurmhaut umfasste passive Mechanismen zur Aufnahme von Natrium und Chlorid über die apikale Membran sowie eine passive Elimination von Kalium und Chlorid und eine passive Aufnahme von Natrium über die basolaterale Membran. Außerdem beschrieb er einen in der basolateralen Membran lokalisierten aktiven Transport von Natrium aus der Zelle heraus und Kalium in die Zelle hinein. Ihm fiel weiterhin auf, dass die Aufnahme von Natrium aus dem umgebenden Medium konzentrationsabhängig war. So sank die Natriumabsorption über die apikale Membran bei steigender Natriumkonzentration in der die Membran umspülenden Ringerlösung.

Prusch (Prusch and Otter 1977) machte ähnliche Messungen an der Haut des Regenwurms und wandte dabei dieselben Methoden an. Er verwendete aber künstliches Teichwasser als apikale und eine Regenwurm-Ringerlösung als basolaterale Badlösung. Unter diesen Bedingungen fand er eine durchschnittliche transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) von -16 mV am intakten Tier und -14 mV an isolierten Hautstücken. Aufgrund dieser guten Übereinstimmung arbeitete er in seinen weiteren Versuchen mit isolierten Stücken der Rückenhaut des Regenwurms. Die Ausgangspotenzialdifferenz war durch die Applikation verschiedener Substanzen beeinflussbar. So sank die PD bei apikaler Gabe von 100 µM Amilorid reversibel um ca. 10 mV. Gleichzeitig sank der Natriumflux von apikal nach basolateral. Der Natriuminflux war auch von der externen Natriumkonzentration abhängig. Insgesamt erfolgte er gegen einen Konzentrationsgradienten und in gewissen Bereichen führte ein höheres Angebot an Natrium auch zu einer Steigerung der PD. Es wurden hier allerdings nur Konzentrationen bis 20 mM getestet. Somit muss dieses Ergebnis nicht unbedingt im Gegensatz zu Tercafs Beobachtungen stehen.

Es wurde weiterhin vermutet, dass Chloridionen nicht unwesentlich an der Aufrechterhaltung der (unter Kontrollbedingungen negativen) PD beteiligt waren. Aus diesem Grunde wurde die Wirkung von 100 µM Furosemid (apikal) untersucht und gefunden, dass durch diese Substanz die PD weniger negativ wurde und gleichzeitig der Chloridinflux abnahm.

Somit beschrieb Prusch den Natrium- und auch den Chloridtransport als elektrogen und nicht komplett unabhängig voneinander. Er diskutierte allerdings auch, dass die isolierte Haut zwar ähnliche elektrophysiologische Parameter aufwies wie der Gesamtorganismus,

wobei sie aber gleichzeitig von wichtigen nervalen und hormonellen Regulationsmechanismen getrennt war.

Lange Zeit traten Untersuchungen zur Osmo- und Volumenregulation des Regenwurms in den Hintergrund, doch in den letzten Jahren gewann das Tier vor allem als Bioindikator im Umweltschutz wieder an Bedeutung.

Fischer (Fischer, Toth et al. 2001) machte Experimente zur Wirkung von Deltamethrin auf die Volumen- und Wasserbalance bei *Eisenia*. Deltamethrin ist ein pyrethroides Insektizid mit neurotoxischer Wirkung, welches im Regenwurmkörper akkumulieren kann. Der Autor ermittelte, dass sowohl Deltamethrin als auch eine hyperosmotische Salzlösung (1 % NaCl) und auch Amilorid eine Verringerung der Körpermasse lebender Regenwürmer aufgrund eines Verlusts an Körperwasser bewirkten. Dabei war der Deltamethrineffekt unabhängig davon, ob die Tiere intakt oder dekapitiert waren, und der Effekt war recht schnell (innerhalb von 3 Stunden). Demgegenüber kam der volumenreduzierende Effekt des Amilorids erst nach 72 Stunden zum Tragen. Der Autor diskutierte, dass Deltamethrin eventuell das Schließen von epithelialen Natriumkanälen verlangsamte und so ein schneller Natriumfluss in Richtung des hypoosmotischen Mediums ermöglichte. Demgegenüber soll durch Amilorid die aktive Aufnahme von Natrium aus der Umgebung durch Amilorid blockiert worden sein, was zur Folge hatte, dass die Tiere den langsamen Verlust an Natrium im hypoosmotischen Medium nicht durch Aufnahme ausgleichen konnten.

Zusammenfassend ermöglichen es also die Mechanismen der Wasserelimination in Form von hypotonem Urin, verbunden mit einer starken Salzresorption im Nephridium sowie einer Absorption über die Nahrung und die Haut dem Regenwurm, ein der Umgebung gegenüber hyperosmotisches Körpermilieu aufrecht zu erhalten. Eine Schlüsselrolle scheinen hierbei eine amiloridsensitive Natriumaufnahme über die Haut und den Darm sowie eine furosemidsensitive Chloridabsorption zu spielen. Hinsichtlich der Regulation und Modulation der hierfür verantwortlichen Ionentransportmechanismen wurden ebenfalls Untersuchungen gemacht.

## **2.4 Regulation und Modulation der Elektrolythomöostase bei den Anneliden**

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, gibt es Substanzen, deren Effekt auf den Wasserhaushalt des Regenwurms von neurohormonellen Regulationsmechanismen unabhängig ist (z.B. der Deltamethrineffekt). Im Gegensatz dazu zeigte sich aber durchaus eine Abhängigkeit der Regulation des Körperwassergehaltes sowie der ionalen Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten vom Vorhandensein der Kopfganglien unter bestimmten Bedingungen.

Kamemoto (Kamemoto 1964) untersuchte die Veränderung der Körpermasse auf der einen Seite und der Natriumkonzentration im Blut und der Coelomflüssigkeit auf der anderen

Seite bei Regenwürmern, deren Ober- bzw. Unterschlundganglion entfernt wurde. Dabei kam er zu dem Ergebnis, dass eine Entfernung des Oberschlundganglions zu einer sehr viel stärkeren Zunahme der Körpermasse innerhalb der ersten Stunden führte, wenn die Tiere in Leitungswasser gehalten wurden, als es bei Regenwürmern der Fall war, deren Unterschlundganglion fehlte. Letztere unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe intakter Tiere. Gleichzeitig sank die Natriumkonzentration der Körperflüssigkeiten. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es einen „Hirnfaktor“ gibt, der in die Osmo- und Volumenregulation des Regenwurms involviert ist. Dabei wirkt dieser vermutlich chemische Faktor sowohl auf die Wasserpermeabilität der Haut als auch auf die Regulation des Natriumtransports aus.

Durchon (Durchon 1967) nahm auf Kamemoto Bezug und beschrieb ganz ähnliche Versuche. Er fand heraus, dass dezerebrierte Regenwürmer in destilliertem Wasser sehr schnell an Gewicht zunahmen, wobei die Natriumkonzentration sank. Diese Effekte ließen sich durch Injektion eines „Hirnhomogenates“ verhindern. Somit postulierte auch er einen humoralen Faktor mit Ursprung in der Hirnregion, der für die Osmo- und Volumenregulation mitverantwortlich war.

Zehn Jahre später machte Carley (Carley 1975) gezielt Versuche, um die von Kamemoto aufgestellten Hypothesen zu überprüfen. Er verglich die Wasserdurchlässigkeit der Haut von normalen Regenwürmern mit der von vollständig hydrierten und kam zu dem Ergebnis, dass letztere eine deutlich höhere Wasserpermeabilität hatten, was darauf hindeutet, dass die Würmer sich der Feuchtigkeit ihrer Umgebung in gewissen Grenzen anpassen können. Auch er stellte fest, dass dezerebrierte Würmer in hypotonem Aussenmedium schneller und mehr Wasser aufnahmen als die intakten Kontrolltiere, wenn sie vorher nicht in Wasser gehalten wurden. Keine Unterschiede in der Wasseraufnahme fand er, wenn alle Gruppen an den Lebensraum Wasser adaptiert und somit vollständig hydriert waren. Beim Prozess der Dehydratation unterschieden sich die Gruppen insgesamt nicht voneinander. Bei allen stieg der osmotische Druck der Coelomflüssigkeit an. Eine erfolgreiche Reimplantation des Oberschlundganglions gelang Carley erst später (Carley 1978a). Nun hatte er entweder ganze Oberschlundganglien in die Körperhöhle transplantiert oder ein „Hirnhomogenat“ hierhin injiziert. Er bestätigte die Hypothese Kamemotos hinsichtlich eines chemischen Faktors, der vermutlich im Hirnbereich gebildet wird, allerdings sah er die Effekte auf die Ionenkonzentration der Körperflüssigkeiten als sekundären Effekt nach einem verstärkten Wassereinstrom an.

Auch Zimmermann (Zimmermann 1971) beschäftigte sich mit dieser Thematik und beschrieb Versuche zur gezielten Ausschaltung einzelner Nervenbahnen und Areale im zentralen Nervensystem des Regenwurms. Aufgrund physiologischer und morphometrischer Untersuchungen kam er zu dem Schluss, dass die Dehydratation bei *Lumbricus* von mindestens zwei Regelsystemen kontrolliert wird, in denen aminerge und peptiderge neurosekretorische Ganglienzellen verknüpft sind. Die neuronalen Schaltelemente vermutete er im Ober- und Unterschlundganglion, wobei er das übergeordnete Regelzentrum in einem bestimmten Areal des Oberschlundganglions lokalisierte. In seinen Dehydratationsexperimenten beobachtete er einen zunächst steilen

Anstieg des Wasserverlustes in den ersten 30 Minuten, doch dann setzte eine Ausschüttung von Neurosekret ein, die dem Wasserverlust für kurze Zeit wirksam entgegen wirkte. Nach Leerung der Neurosekretspeicher verloren die Tiere wieder an Körpermasse, bis nach 3 bis 4 Stunden die Neusynthese abgeschlossen war und eine zweite Phase der Gegenregulation zu beobachten war. In späteren Versuchen zeigte der Autor auch einen mit der Neusynthese von Neurosekret einhergehenden Gehalt an Proteinen und Nukleinsäuren der peptidergen Neurone im Oberschlundganglion (Zimmermann 1973).

In dieser Publikation diskutierte er auch den zusätzlichen Einfluss der Ganglienzellen des Bauchmarks sowie des peritonealen und des subepidermalen Nervennetzes auf den Wasserhaushalt der Tiere. Ein zusätzlicher Einfluss von rein neuronalen Impulsen auf Haut, Darm und Nephridien lag wegen der dichten nervalen Versorgung dieser Gewebe nahe. Wenning (Wenning 1986) beschrieb im Detail die an der Innervation der Nephridien beim Blutegel beteiligten Neurone. Jedes der 34 Nephridien wird von einem sensorischen nephridialen Nerv versorgt. Der ist ein Abzweig des anterioren Nervs, der wiederum jedem segmentalen Ganglion entspringt. Dabei reagieren die Neurone des nephridialen Nervs zwar weder direkt auf Volumenänderungen noch auf reine Osmolaritätsveränderungen, aber ihre Aktivität ändert sich mit der Chloridkonzentration im Blut. Dabei ist es offensichtlich so, dass der Nerv unter normalen Bedingungen, also bei verhältnismäßig geringen extrazellulären Chloridkonzentrationen, spontan aktiv ist und FMRF-amid (ein endogenes Peptid mit der Primärstruktur Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) freisetzt welches die NaCl-Resorption fördert (Wenning 1996). Im Gegensatz dazu bewirkt eine Erhöhung der extrazellulären Chloridkonzentration (z.B. nach einer Blutmahlzeit oder bei Einwandern in Brackwasser) eine verminderte FMRF-amid Ausschüttung, gefolgt von einer starken Natriurese.

Hinsichtlich des Regulationsfaktors, der im Oberschlundganglion vermutet wurde, konnten über dessen chemische Natur lange Zeit nur Vermutungen angestellt werden. Zerbst-Boroffka (Zerbst-Boroffka, Wenning et al. 1983) stellte fest, dass Egel, die in Salzwasser gehalten wurden, offensichtlich einen antidiuretischen Faktor in ihrem Blut hatten, der mehrere Stunden wirksam aber hitzeinstabil war. In späteren Experimenten untersuchte sie die Wirkung einzelner Substanzen auf den Harnfluss des Egels (Zerbst-Boroffka, Bazin et al. 1986). Weder Ecdyson noch Dopa, Dopamin, Adrenalin, Acetylcholin oder cAMP beeinflussten die Urinproduktion. Nur Arg-Vasopressin und Lys-Vasopressin wirkten deutlich inhibitorisch an isolierten Nephridien.

Letztere Befunde decken sich mit der Tatsache, dass mit immunhistochemischen Methoden im zentralen Nervensystem verschiedener Anneliden schon bald darauf eine Reaktion auf Antikörper gegen unterschiedliche Peptidhormone von Vertebraten gefunden wurde. Al-Yousuf (Al-Yousuf 1990) gibt einen Überblick über die Vielfalt der immunreaktiven Bezirke und Substanzen bei verschiedenen Anneliden. Es fiel auf, dass gerade die Hormone der Hypophyse und des Hypothalamus offensichtlich phylogenetisch hoch konserviert waren, so dass positive Reaktionen mit Antikörpern selbst gegen Säugetier-Peptide möglich waren (Mizuno and Takeda 1988; Mizuno and Takeda 1988a). Da Anneliden nicht über spezielle Hormondrüsen verfügen (Highnam and Hill 1969), liegt

ein Mechanismus der Neurosekretion zur hormonellen Kontrolle von Wachstum, Regeneration, Reproduktion und auch der Osmoregulation nahe.

1994 gelang einer japanischen Gruppe (Oumi, Ukena et al. 1994) erstmals die Isolierung eines Peptidhormons, das zur Oxytocin/Vasopressin-Familie gezählt werden kann, aus einem Regenwurm (*Eisenia*). Aufgrund der kontraktionsfördernden Wirkung des Peptids auf die Nephridien des Regenwurms diskutierten die Autoren eine mögliche Involvierung des Hormons in die Osmoregulation des Tieres. Dank einer Kooperation mit den Autoren, war es uns möglich, diese Substanz zu erhalten und in eigenen Versuchen einzusetzen (vgl. Kap. 4.3.4). In weiteren Publikationen beschrieben die Entdecker des sogenannten Annetocins (Anneliden-Oxytocin) auch eine Wirkung auf die Darmmotilität sowie die Reproduktion der Würmer. Eine Injektion des Peptids in die Leibeshöhle führte bei adulten Tieren zur Abscheidung von Mukus aus dem Clitellum wie zur Ausbildung eines Kokons (Oumi, Ukena et al. 1996). Weiterhin steigerte Annetocin die Darmmotilität des Regenwurms (Oumi, Ukena et al. 1994; Ukena, Oumi et al. 1995). Beide Effekte waren in geringerem Maße auch durch Oxytocin und Vasotocin, nicht jedoch Vasopressin auslösbar. Die Ursache für diesen Unterschied vermuteten die Autoren im Vorkommen unterschiedlicher Aminosäuren an Position 3 im Peptid. Die oxytocinähnlichen Peptide hatten hier eine aromatische und das Vasopressin eine aliphatische Aminosäure. Ein ähnlicher Ansatz bei einer anderen Fragestellung wird auch in der vorliegenden Arbeit diskutiert (vgl. Kap. 5.1.3). Fujino (Fujino, Nagahama et al. 1999) sah in elektrophysiologischen Untersuchungen bei einer serosalen Applikation von 10µM Annetocin keinen Effekt auf Strom, Potenzialdifferenz bzw. Gewebswiderstand der Haut des Blutegels *Whitmania pigra*, ein Ergebnis, auf das in der vorliegenden Arbeit im Speziellen eingegangen wird (vgl. Kap. 5.1.3). Hinsichtlich der Verteilung des Peptids im Organismus wurden immunhistochemische Untersuchungen gemacht, welche zeigten, dass sich Annetocin-immunreaktives Material hauptsächlich im Unterschlundganglion und auch im Oberschlundganglion befand (Takahama, Haibara et al. 1998). Nach einer Charakterisierung der cDNA zeigten auch *in-situ*-Hybridisierungsexperimente, dass das Annetocin-Gen ausschließlich in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert wurde (Satake, Takuwa et al. 1999).

Bei den Hirudinen und den Polychaeten wurden etwa zur selben Zeit verschiedene Peptide aus dem zentralen Nervensystem isoliert. Die Gruppe um Salzter (Salzter, Bulet et al. 1993; Salzter, Watzet et al. 1993; Salzter, Bulet et al. 1994; Salzter, Bulet et al. 1995; Salzter, Bulet et al. 1996) beschrieb Angiotensin-II-amid, GDPFLRF-amid, Lysin-Conopressin sowie LORF (Leech Osmoregulator Factor), alles Peptide, die aus *Erpobdella* isoliert wurden. Dabei war Lys-Conopressin strukturell sehr eng mit den oxytocinähnlichen Peptiden verwandt (vgl. auch Kap. 4.3.4), wohingegen LORF bei vergleichbarer Größe eine ganz andere Aminosäuresequenz aufwies. Wenn dieser Faktor in Blutegel injiziert wurde, so wirkte er dort antidiuretisch. Wasser wurde verstärkt aufgenommen und die Natriumleitfähigkeit der Egelhaut nahm ab. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde vom gleichen Forscherteam im Weiteren die Wirkung einiger Neuropeptide auf den Natriumtransport an der Blutegelhaut untersucht (Milde, Weber et al. 2001). Dabei kam

heraus, dass Lys-Conopressin, LORF, Angiotensin-II-amid, Vasopressin, L-Dopa und Dopamin sowohl den Kurzschlussstrom an sich, im Besonderen aber den amiloridsensitiven Strom senkten. Serotonin und GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) hatten keine Auswirkung auf diese Parameter. Somit scheinen Peptidhormone beim Invertebraten ebenso wie beim Vertebraten für die schnelle Kontrolle der Elektrolythomöostase mitverantwortlich zu sein. In den publizierten Versuchen hatten Invertebraten- wie Vertebratenhormone vergleichbare Effekte, was auf eine starke Konservierung ihrer Struktur im Laufe der Evolution zurückzuführen sein mag. Allerdings fiel auf, dass die Effekte an der Blutegehhaut entgegengesetzt der Wirkung der antidiuretischen Hormone beim Vertebraten waren. Denn die steigern die Natriumaufnahme über amiloridsensitive Natriumkanäle im Nephron von Wirbeltieren. Als mögliche Ursachen diskutierten die Autoren eine Änderung der Effektormoleküle oder eine Kopplung der Rezeptoren an andere second-messenger Systeme im Laufe der Evolution.

Fewou (Fewou and Dhainaut-Courtois 1995) verglich seine Ergebnisse hinsichtlich des Vorkommens von osmoregulatorischen Peptiden im Polychaeten *Nereis diversicolor* mit den Ergebnissen von Salzet. Auch er fand immunreaktives Material, welches mit Antikörpern gegen oxytocinähnliche Peptide sowie Angiotensin II-amid reagierte, im Hirnbereich, aber auch im ventralen Nervenstrang. In zusätzlichen Versuchen stellte er fest, dass beide Hormone einen antidiuretischen, volumensteigernden Effekt bei *Nereis* hatten, der mit Antiseren gegen Angiotensin-II oder gegen Oxytocin aufgehoben werden konnte. Hinsichtlich des Vergleichs mit Salzets Ergebnissen fiel auf, dass Angiotensin-II-amid innerhalb desselben Tierstammes eine entgegengesetzte Wirkung bei dem marinen *Nereis* verglichen mit dem limnischen *Hirudo* hatte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es große Ähnlichkeiten im Vorkommen von Peptidhormonen bei den Anneliden, verglichen mit den Vertebraten gibt. Ebenso wie bei den Wirbeltieren, werden diese Hormone offensichtlich im Hirnbereich gebildet und dann ins Blut sezerniert. Gerade Peptide der Oxytocin/Vasopressin-Familie scheinen dabei auch bei den Invertebraten eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase und des Wasserhaushaltes zu spielen, die jedoch nicht unbedingt bei allen Vertretern dieses Tierstammes gleich sein muss, und auch nicht immer vergleichbar mit der bei Wirbeltieren ist.

## 2.5 Histologie der Regenwurmhaut

Da alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit direkt auf Versuchen mit der äußeren Haut des Regenwurms beruhen, soll deren histologischer Aufbau im Folgenden beschrieben werden. Über die Histologie der Epidermis von Regenwürmern gibt es eine Reihe von Arbeiten, die sowohl aufgrund lichtmikroskopischer (Claparède 1862; Grassé 1959) als auch elektronenmikroskopischer Untersuchungen entstanden sind (Grassé 1959; Coggeshall 1966; Burke 1974; Richards 1974; Richards 1978).

Die erste Beschreibung des „Leibesschlauches“ fand sich bei Claparède. 1862 zählte er zum Leibesschlauch des Regenwurmes die Cuticula, die Hypodermis, die Ringmuskelschicht, die Längsmuskelschicht und das Peritoneum. Die Cuticula beschrieb er als „farblose, zellenlose, von feinen Porenkanälen durchzogene Schicht [...], welche unmittelbar auf ihrer Matrix der sogenannten Hypodermis ruht“. Er ging davon aus, dass die Hypodermis die Cuticula absonderte. Den Begriff Hypodermis wählte er, weil er diese Schicht für eine „sehr abweichende Epithelart“ hielt. Zwar erkannte er in Vertikalschnitten ein 0,03 bis 0,06 mm dickes Zylinderepithel, und er sah auch, dass die Kerne in zwei Ebenen lagen, nämlich im „mittleren Niveau und ganz in der Tiefe an der Grenze der Muskelschicht“. Doch im Flächenpräparat verwirrte ihn ein maschiges „Wabennetz“, welches mit einer farblosen Substanz gefüllt erschien. Bei näherem Hinsehen erkannte er, dass die Substanz aus „zahlreichen, kaum 1 mm im Durchmesser betragenden Kügelchen“ bestand. Über diese „granulösen Wabenräume“ stellte er die Vermutung an, dass es sich um einfache Drüsen handeln könnte, die jedoch nicht für die Sekretion der Cuticula verantwortlich waren. Probleme bereitete ihm die Tatsache, dass er keine Kerne im Drüsenkörper erkannte und er postulierte daher das Vorkommen von sogenannten interzellularen Drüsenkörpern. Beschreibungen von Zeitgenossen wie z.B. Leydig (1821-1908), die von Schleimzellen sprachen, diskutierte er zwar, lehnte sie jedoch ab, solange er nicht jeder der Zellen einen Kern zuordnen konnte.

Knapp 100 Jahre später beschrieb Grassé (Grassé 1959) die Epidermis der Oligochaeten als einschichtiges Epithel, welches sich prinzipiell aus zwei Zellarten zusammensetzte: funktionellen Zellen und den Ersatzzellen. Erstere teilte er wiederum in 2 Klassen ein: 1. Stützzellen mit dichtem Cytolasma und 2. Drüsenzellen. Die Drüsenzellen unterteilte er seinem dichotomen Schema folgend weiter in basophile Mukuszellen mit alveolärerer Sekretion und in Zellen mit granulärer Sekretion (eiweißreich aber nicht mukös). Die Ersatzzellen oder Basalzellen beschrieb er an der Basis der Epithelzellen und er postulierte, dass sie als undifferenzierte Blasten dem Zellnachschieben dienen. Auch Grassé zufolge wird die Cuticula von den Epithelzellen sezerniert. Ein eigenes Kapitel widmete er den Sinneszellen. So kommen über den ganzen Körper verteilt Photorezeptoren vor, die im Kopfbereich jedoch konzentriert liegen.

7 Jahre später veröffentlichte Coggeshall (Coggeshall 1966) seine elektronenmikroskopischen Studien über die Epidermis von *Lumbricus terrestris*. Die Epidermis bestand für ihn aus einem epidermalen Epithel mit einer aufgelagerten collagenen Cuticula, die vermutlich von den Epithelzellen produziert wird. Diese Cuticula beschrieb er als eine Anordnung von Kollagenfasern, eingebettet in einer amorphen Matrix. Das Epithel selbst ist laut Coggeshall 50 bis 70 µm hoch. Zwischen Epithel und Cuticula sah er keine Lamina, wohl aber unterhalb der Epithelzellen als Abgrenzung zum Muskelgewebe hin. Hier trennt ihn zufolge eine collagene Lamina das Epithel von der Körperwandmuskulatur. Er betonte, dass keine Fibroblasten nachgewiesen werden konnten. Das epidermale Epithel teilte er ein in: Stützzellen, Schleimzellen und Basalzellen. Reife Mukuszellen beschrieb er als gefüllt mit Schleim, was sich lichtmikroskopisch als PAS-positives Material widerspiegelte (PAS = Periodic Acid Schiff, Färbung von Glycoproteinen in Mukus). An

der Oberfläche der Stützzellen fielen ihm zahlreiche Mikrovilli auf, und an der Basis sorgen Hemidesmosomen für Halt am darunter liegenden Fasergewebe. Für den starken Zusammenhalt im Epithel zeigten sich drei Strukturen verantwortlich: die Zonula adhaerens, die macula adhaerens und septierte Desmosomen. Alle Epithelzellen haben Coggeshall zufolge die gleiche Kernform und unterscheiden sich nur in Größe und Form.

1974 beschäftigte sich Burke mit Cuticula und Epidermis von *Eisenia foetida*. Auch sie beschrieb die Epidermis als von einer Cuticula bedeckt und auf einer Basallamina aufsitzend. Sie nannte die Epidermis ein pseudo-mehrschichtiges Epithel, welches aus drei Hauptzelltypen besteht: Stützzellen, Basalzellen und Drüsenzellen sowie einer kleinen Gruppe von Zellen mit apikalen Cilien. Die Stützzellen reichen ihrer Beschreibung nach von der Basallamina bis zur Cuticula, wohingegen die Basalzellen nur in Kontakt mit der Basallamina stehen. Dadurch erhält das Epithel ein pseudo-mehrschichtiges Aussehen. Die häufigsten Zellen sind laut Burke Stützzellen. Sie haben große längliche Zellkerne und sind über Hemidesmosomen an der Basallamina und an ihren Nachbarzellen verankert. Sie zeigen eine Polarisierung im Vorkommen der Organellen. Vor allem apikal finden sich Golgikomplexe und Mitochondrien. Im ganzen Cytoplasma verteilt sah Burke Strukturen unterschiedlicher Größe, bei denen es sich um Lysosomen oder Pigmente handeln könnte. Die Basalzellen kommen zwischen den anderen Zellen vor und befinden sich an der Basis der Stütz- und Drüsenzellen. Letztere überspannen die ganze Weite der Epidermis. Die Hauptsekretion scheint über membrangebundene Granula zu erfolgen. Zwischen den Segmenten beschreibt sie die Epidermis als dünner und frei von Drüsenzellen.

Die umfangreichsten Angaben zur Histologie der Anneliden-Epidermis finden sich bei Richards (Richards 1974; Richards 1978). Auch sie beschrieb die Epidermis als zwischen der collagenen Cuticula und der Basallamina, die ebenfalls aus collagenen Fasern besteht, liegend. Die Cuticula bestehe aus Lagen von rechtwinklig gekreuzten Collagenfasern in einer feinfaserigen Matrix. Microvilli, die von der Epitheloberfläche kommen, durchdringen Richards zufolge diese Matrix und enden frei außerhalb der Cuticula. Die Stützzellen oder Säulenzellen beschreibt sie als unmodifizierte Deckzellen des Körpers, die alle apikale Microvilli tragen. Über die Funktion der Basalzellen trifft sie keine abschließende Aussage. Im Allgemeinen werden sie mit der Regeneration des Epithels in Verbindung gebracht, aber auch auf phagozytotische Funktionen weist sie hin. Die Drüsenzellen teilte Richards erstmals weiter in drei Untergruppen ein. Dabei unterscheidet sie erstens große granulierte, orthochromatische Zellen, die einen Mucopolysaccharid-Protein-Lipid-Komplex sezernieren, zweitens metachromatische Zellen mit netzartiger Struktur, welche einen carboxylierten sauren Schleim geringer Viskosität produzieren, und drittens die seltener vorkommenden kleinen granulierten Zellen, die sie als proteinreich beschreibt.

In der vorliegenden Arbeit wird nun zum einen auf die oben beschriebenen Literaturaussagen hinsichtlich der Morphologie und der Physiologie der Haut des Regenwurms aufgebaut und darüber hinaus werden sie zu den eigenen Ergebnissen in Bezug gesetzt.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Das Versuchstier

#### 3.1.1 Biologie des Regenwurms

Bei dem verwendeten Versuchstier handelte es sich um adulte (geschlechtsreife) Exemplare des Tauwurms (*Lumbricus terrestris*) aus dem Phylum Annelida (Ringelwürmer).

##### 3.1.1.1 Systematik

Reich:	Animalia (Tiere)
Unterreich:	Metazoa (Vielzeller)
Abteilung:	Eumetazoa (Gewebetiere)
Unterabteilung:	Bilateria (achsensymmetrische Tiere)
Stammgruppe:	Protostomia (Urmünder)
Überstamm:	Lophotrochozoa
Stamm:	Annelida (Ringelwürmer)
Klasse:	Clitellata (Gürtelwürmer)
Ordnung:	Oligochaeta (Wenigborster)
Familie:	Lumbricidae (Regenwürmer)
Gattung:	<i>Lumbricus</i> (Tauwurm)
Art:	<i>Lumbricus terrestris</i>

Unterschiedliche Autoren vertreten jedoch viele verschiedene Auffassungen über die genaue zoologische Systematik der Ringelwürmer. Das ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass eine solche Einteilung über Jahrhunderte hinweg nach vorwiegend morphologischen Gesichtspunkten erfolgte, in den letzten Jahren aber die Molekularbiologie ganz neue Ansatzpunkte in der Untersuchung von Abstammungsverhältnissen offenbarte. Ein weiteres Problem der Systematik der Anneliden liegt darin begründet, dass die Klasse der Polychaeten nicht monophyletisch sondern paraphyletisch ist. Demnach ist auch die genaue Stellung der Clitellata, die klar monophyletisch sind, nicht gesichert (Dorresteijn 2004).

### 3.1.1.2 Lebensraum

*Lumbricus terrestris* ist ein weltweit (mit Ausnahme der Antarktis) vorkommender terrestrischer Vertreter der Anneliden. Bei uns ist der bis zu 30 cm lange Wurm hauptsächlich in Wiesen, Gärten und Obstanlagen zu finden, wo er bis zu 3 m tiefe Gänge gräbt und sich von in Erde befindlichen Pflanzenresten sowie dem Kot von Streuzersettern ernährt (Westheide and Rieger 1996). Im Gegensatz dazu findet man z.B. in der Ackererde hauptsächlich Vertreter der Gattung *Allolobophora* und in Komposthaufen vorwiegend die Gattung *Eisenia*. Der Name Tauwurm ist auf die Nachtaktivität der Tiere zurückzuführen, welche zur Folge hat, dass man sie vorwiegend im Morgentau zu Gesicht bekommt. Die Bezeichnung Regenwurm geht vermutlich nicht darauf zurück, dass der Wurm bei Regen an die Erdoberfläche „flüchtet“, sondern auf seine enorme Aktivität in der Erde, weshalb er in den letzten Jahrhunderten auch als „reger Wurm“ bezeichnet wurde.

### 3.1.1.3 Morphologie

Aus dem Wortstamm von „Anneliden“ (annelus bzw. anulus = kleiner Ring) geht hervor, dass diese Tiere ringförmig segmentiert sind. *Lumbricus* hat als Oligochaet (= Wenigborster) 8 Borsten pro Segment. Die Anzahl der deutlich gegeneinander abgesetzten Segmente beläuft sich auf ca. 100 pro Tier. Die äußerlich sichtbare Metamerie des Tieres setzt sich auch im Körperinneren fort. Jedes Segment wird von paarigen Coelomkammern (sekundäre Leibeshöhle) erfüllt und enthält eine vollständige Ausstattung an Ganglien und Metanephridien. Muskulöse Dissepimente unterteilen die Leibeshöhle und stellen in ihrer Funktion als hydrostatisches Skelett eine Voraussetzung für die grabende Lebensweise von *Lumbricus* dar. In bestimmten Körperregionen treten Differenzierungen einzelner Segmentgruppen auf (Heteronomie). Das ist z.B. im Bereich des Clitellums der Fall, einem Drüsengürtel, dessen Sekret die zwittrigen Geschlechtspartner bei der Kopulation verbindet und die Kokonschale für die befruchteten Eier liefert (Wehner and Gehring 1995).

*Lumbricus* verfügt über ein geschlossenes Blutgefäßsystem, bestehend aus je einem ventralen und einem dorsalen Längsgefäß, welche über Ringgefäße miteinander verbunden sind. Der Blutfluss ist abhängig von Kontraktionen des Dorsalgefäßes und Bewegungen der Leibeshöhle (Anderson 1998). Deren Aufbau ist detailliert in Kap. 2.5 beschrieben. Die Aufnahme von Flüssigkeit geschieht über die Haut und auch über den Mund. Zur Flüssigkeitsausscheidung dienen die in fast jedem Segment vorkommenden Metanephridien (vgl. hierzu Kap. 2.3.2.1). Die Verdauung des über den Mund aufgenommenen organischen Substrates erfolgt im Darm, der sich wie ein Schlauch durch den gesamten Körper des Tieres zieht.

Das Nervensystem des Regenwurms beginnt mit dem über dem Pharynx gelegenen Oberschlundganglion, welches über zwei Nervenfasern mit dem Unterschlundganglion verbunden ist. Von hier aus durchzieht ein paariger Ganglienstrang den gesamten Körper nach caudal (Strickleiternnervensystem). Einem jeden Segment ist ein Ganglion zugeordnet, von welchem wiederum je 3 segmentale Nervenpaare ausgehen. Die Ganglien empfangen Impulse von sensorischen Zellen, die über den ganzen Körper verteilt in der Haut liegen (z.B. Photorezeptoren).

### **3.1.2 Tierhaltung**

Die Tiere wurden von Martin Langhoff (Düren, Deutschland) bezogen. Sie wurden in Plastikwannen, gefüllt mit einer vom gleichen Vertreiber erhältlichen angefeuchteten Erdmischung, welche weiches Weidenholz als Nahrungsquelle enthielt, in abgedunkelten Räumen bei 18 °C gehalten. Eine zusätzliche Fütterung oder Behandlung der Würmer fand nicht statt.

## **3.2 Aufbau und Durchführung der Versuche**

### **3.2.1 Präparationstechniken**

Die Präparation der Regenwürmer erfolgte in einer mit Wasser gefüllten Präparierschale auf Wachs. Durch einen schnellen Schnitt wurden die Segmente cranial des Clitellums des Wurms abgetrennt, sofort weiter zerkleinert und in 70 %igem Ethanol abgetötet. Der verbleibende caudale Teil des Wurms wurde mit Stecknadeln festgesteckt, um den Muskelbewegungen entgegenzuwirken. Der Wurm wurde der Länge nach auf der ventralen Seite aufgeschnitten. Die Körperwand wurde durch Abschaben von anhaftenden Organen wie z.B. Darm, Blutgefäßen, Bauchganglienstrang und Nephridien befreit. Für elektrophysiologische Versuche wurde die Haut in einen mit Nadeln besetzten Plastikring eingespannt der in die Ussingkammer montiert werden konnte.

### **3.2.2 Mikroskopische Untersuchungen**

Für eine histologische Untersuchung des verwendeten Gewebes unter dem Lichtmikroskop bzw. dem Laser-Scanning-Konfokalmikroskop, wurden nach Fixierung des Gewebes Gefrierschnitte angefertigt, die letztlich angefärbt werden konnten.

### 3.2.2.1 verwendete Lösungen

Fixans:	4 % Paraformaldehyd
	5 % Saccharose
in Pufferlösung:	a) 4 Teile 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	b) 1 Teil 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	0,9 % NaCl
	pH 7,4 (eingestellt mit b)

### 3.2.2.2 Fixierung des Gewebes

Bei der Fixierung ist ein Kompromiss zwischen optimaler Strukturhaltung im Gewebe und einer möglichst geringen Maskierung antigener bzw. anzufärbender Strukturen zu finden. Die Struktur wird vor allem durch Fixantien auf Aldehydbasis wie z.B. (Para)Formaldehyd erhalten.

Der zuvor getötete Regenwurm wurde 1 Stunde im Fixans inkubiert. Dann wurden mit einer Rasierklinge Teilstücke von jeweils 3 äußeren Segmenten abgetrennt und in ein Schnappdeckelgefäß mit frischem Fixans gegeben. Die kleinen Gewebsstücke wurden 3 Stunden auf einem Schüttler im Fixans inkubiert und dann gründlich mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Saccharosereihe (10 %, 20 %, 30 %) bis jeweils zur Gewebssättigung (Sinken des Gewebes) inkubiert. Dieser Schritt diente einem Schutz des Gewebes vor Gefrierschäden.

### 3.2.2.3 Einbettung des Gewebes

Nach dem Fixieren und Inkubieren in Saccharose wurden die Gewebsstücke für das Schneiden am Gefriermikrotom vorbereitet. Hierfür wurden sie auf ein 1cm x 1cm großes Stück Kartonpappe gebracht, mit Gewebeeinbettlösung eingebettet und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan als Kältevermittler gefroren. Die gefrorenen Präparate wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Filmdöschchen aufbewahrt oder direkt am Gefriermikrotom geschnitten.

### 3.2.2.4 Herstellung der Gefrierschnitte

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wurden Gefriermikrotome (Microm, HM 500 OM bzw. Frigocut 2800) verwendet. Die in Blöcken gefrorenen Präparate wurden mittels Tissue-Tec® auf dem Objekthalter aufgefroren und bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kammer- und Objekttemperatur) in Schnittdicken von 14 bzw. 20  $\mu\text{m}$  zerlegt. Die Schnitte wurden an die Objektträger angeschmolzen und luftgetrocknet. Im Gegensatz zu unfixiertem Material, bei dem Gefrierschnitte durch das Antrocknen am Objektträger haften, muss für fixiertes Material eine Eiweißschicht zwischen Objektträger und Schnitt vorhanden sein (Böck 1989). Daher wurden vorbehandelte Objektträger der Firma Menzel (Superfrost plus) verwendet.

### 3.2.2.5 Histologische Färbungen

Die fertigen Gefrierschnitte wurden kurz in aqua bidest gewässert und getrocknet. Anschließend wurden sie 10 min in Azeton getaucht, an der Luft getrocknet und im Objektträgerkasten bei Raumtemperatur bis zur Färbung aufbewahrt.

Die Färbungen wurden vom histologischen Labor des Institutes für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. E. Burkhardt) durchgeführt. Die genauen Rezepturen finden sich im Anhang (Kap. 9.5)

Als Kern-Plasma-Übersichtsfärbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt. Als Farbstoff wirkt zum einen das Oxidationsprodukt des Hämatoxylins Hämatein, welches durch Zugabe von Alaunsalzen stark positiv geladene Hämatoxylinlacke bildet. Diese zeigen basophile Strukturen an und werden vor allem für die Kernfärbung verwendet. Die Zellkerne werden intensiv blau angefärbt. Als Gegenfärbung verwendet man Eosin, welches das Zytoplasma rötlich färbt. (Claparède 1862; Böck 1989; Lyon 1994)

Bei der Goldner-Färbung handelt es sich um eine Modifikation der Massonschen Trichromfärbung nach Goldner. Hierbei erfolgt eine Kernfärbung mit Weigertschem Eisenhämatoxin, welches die Zellkerne bräunlich-schwarz darstellt. Die weitere Färbung erfolgt mit Ponceau-Fuchsin-Azophloxin, und nach Differenzierung in Phosphormolybdänsäure-Orange und Gegenfärbung mit Lichtgrün stellt sich das Zytoplasma ziegelrot und Bindegewebe sowie Schleim grün dar (Romeis 1948).

Für die Masson-Färbung werden die Schnitte mit Eisenhämatoxin nach Weigert gefärbt und in Essigsäure differenziert. Die weitere Färbung mit Phosphormolybdänsäure und Anilinblau läßt die Zellkerne chromatisch schwarz erscheinen, das Protoplasma ziegelrot bis rosa, Muskelgewebe und Gliafasern rot und kollagenes Bindegewebe blau.

Die Luxol-Kresyl-Färbung dient der Darstellung von Nervenzellen. Bei dieser Färbung färben sich das Perikarion und die Nissl-Substanz violett an. Myelinscheiden würden sich blau darstellen. Es wird zunächst mit Luxolblau gefärbt und mit Lithiumcarbonat

differenziert. Schließlich wird mit Kresylviolett gegengefärbt und mit Alkohol erneut differenziert.

Eine Färbung mit Resorcinfuchsin, Eisenhämatoxilin und Pikrinsäure-Thiazinrot führt bei der Elastica v. Gieson-Färbung dazu, dass elastische Fasern dunkelbraun erscheinen, während sich kollagenes Bindegewebe leuchtend rot und glatte Muskulatur gelb darstellen.

Die Azan-Färbung nach Heidenhain ist eine sogenannte Bindegewebsfärbung und stellt dieses deutlich blau dar. Chromatin erscheint rot, Muskulatur rot bis orange, Gliafasern ebenfalls rot und Schleim blau. Als Farbstoffe kommen hierbei Azokarmin und Anilinblau-Orange-Essigsäure zum Einsatz.

### **3.2.2.6 Lichtmikroskopie**

Für Lichtmikroskopische Untersuchungen stand ein inverses Mikroskop (Axiovert 135 M, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zur Verfügung. Desweiteren wurde ein Mikroskop des Typs Olympus BH 2 verwendet, an welches eine digitale Kamera (Olympus Camedia C-3030 Zoom) über einen Adapter (Olympus C-3030 ADL) angeschlossen werden konnte.

### **3.2.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Das inverse Lichtmikroskop Axiovert 135 M (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) war an ein Laser-Konfokal-System Typ MRC 1024 (BioRad, U.K.) angeschlossen. Der verwendete Krypton-Ionen-Laser des Typs ENT R 622 (Coherent Laser Group, USA) produzierte die verwendeten Anregungswellenlängen von 351 nm, 363 nm (beide UV) sowie 488 nm (blau). Es wurde mit Ölimmersion mit einem Fluar 40 x NA 1,30 Objektiv und einem Plan NeoFluor 63 x NA 1,25 Objektiv gearbeitet. Die Bilddaten wurden auf einem PC (Compaq prosignia 300, Betriebssystem OS 2) mit dem LaserSharp Programm 3.1 (BioRad, U.K.) dargestellt und mit Hilfe des Programms Confocal Assistant 4.02 in ein gängiges Bilddateiformat umgewandelt. Die unveränderten Originaldaten wurden immer zusätzlich archiviert. Die in den Abbildungen erscheinenden Farben sind willkürlich gewählt. Emissionen der Wellenlänge 455/30 nm wurde die Farbe grün zugeordnet und Emissionen der Wellenlängen OG 515 nm die Farbe rot. Ansonsten fand keine Bearbeitung der Bilder statt, die die Ergebnisse beeinflusst hätte.

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht darauf, dass ein Lichtstrahl ausgehend von einer kleinen Lochblende (Excitation Pinhole) durch eine Linse auf die zu untersuchende Probe projiziert wird und das emittierende Licht nach Passage eines dichromatischen Spiegels wieder auf einer Lochblende (Detector Pinhole) vor einem Photomultiplier abgebildet wird. Der dichromatische Spiegel reflektiert das Anregungslicht und lässt das emittierte Licht passieren. Da sowohl Excitation Pinhole als auch Detector Pinhole in

Bezug auf die beleuchtete Ebene im Objekt fokussiert sind, wird diese Anordnung konfokal genannt. Durch den beweglichen Probenstisch ist es möglich, ein Bild aus einzelnen Lichtpunkten aufzubauen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man durch eine schichtweise Bildaufnahme (optische Schnitte) auch relativ dicke Objekte scharf abbilden kann. Die einzelnen Schichten können im Weiteren wieder überlagert werden (dreidimensionale Rekonstruktion). Da die Belichtungszeit für jeden Bildpunkt äußerst gering ist (z.B. 0,0038 ms bei 512 x 512 Pixel Bildauflösung), ist eine starke Belichtungsquelle (Laser) notwendig. Das am Photomultiplier ankommende Emissionslicht wird verstärkt und in ein digitales Signal umgewandelt, was eine Bilddarstellung am Rechner ermöglicht.

### 3.2.3 Transepitheliale elektrophysiologische Untersuchungen

Ein Großteil der beschriebenen Ergebnisse beruht auf elektrophysiologischen Messungen, bei denen das Gewebe kontinuierlich mit Salzlösungen gespült wurde und die elektrischen Parameter transepitheliale Potenzialdifferenz, Strom und Widerstand erfasst wurden.

#### 3.2.3.1 verwendete Lösungen

künstliches Teichwasser	NaCl	0,5 mM	pH der Lösung: 7,0
(Artificial Pond-Water, PW)	CaCl <sub>2</sub>	0,4 mM	
	NaHCO <sub>3</sub>	0,2 mM	
	KCl	0,05 mM	
	HEPES	5 mM	

modifiziert nach (Prusch and Otter 1977)

Regenwurm-Ringer-Lösung	NaCl	71 mM	pH der Lösung : 7,4
(Earthworm Ringer's Solution, ERS)	KCl	4 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
	HEPES	5 mM	

modifiziert nach (Cornell 1982)

Natrium-freies Pond-Water	TMA-Cl	0,5 mM	pH der Lösung : 7,0
(PW Natrium-frei)	CaCl <sub>2</sub>	0,4 mM	
	KCl	0,05 mM	

### 3.2.3.2 Messkammer und Perfusionssystem

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten in modifizierten Ussingkammern (hergestellt von S. Kristek, Institut für Tierphysiologie, Universität Gießen). Die präparierte Haut des Regenwurms wird hierbei zwischen die beiden Hälften einer Plexiglaskammer (Abbildungen 1 und 2) montiert, die mit physiologischen Lösungen perfundiert werden. Die beiden Kammerhälften werden lediglich durch das eingespannte Gewebe getrennt, d.h. alle Ionentransporte müssen über dieses Gewebe erfolgen.

Benutzt man auf beiden Gewebseiten identische Ringerlösungen, so besteht weder ein Potenzialgradient noch ein Konzentrationsgradient. Diese Ausgangslage ist insofern ideal, als man dann sicher ist, dass jede gemessene Potenzialabweichung von 0 vom Gewebe herrührt, das die Lösungen trennt. In den hier vorgestellten Versuchen wurde eine andere Ausgangssituation gewählt, da auch zu berücksichtigen ist, dass es für dieses polare Gewebe unphysiologisch ist, apikal und basolateral eine blutisotone Lösung vorzufinden. So wurde die Haut des Regenwurms apikal mit einem "künstlichen Teichwasser" (Artificial Pond-Water) perfundiert, das insgesamt sehr niedrige Ionenkonzentrationen enthielt. Das entspricht aber eher dem Lebensraum des Tieres. Auf der basolateralen Seite wurde mit einer (Regenwurm-)blutisotonen Lösung (ERS) perfundiert, da diese Seite die Verhältnisse im Körperinneren des Tieres widerspiegeln sollte.

Zu Beginn jeder Messung hatte das Gewebe ausreichend Zeit, sich an die Ausgangsbedingungen anzupassen und einen stabilen Strom zu generieren. Es wurden parallel und kontinuierlich die Kurven für die transepitheliale Potenzialdifferenz, den Strom und den Widerstand aufgezeichnet. Durch den Einsatz von Lösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Ionen oder durch Substanzen, die spezifisch einzelne Ionenkanaltypen beeinflussen, ist es möglich, Aussagen über die zum Strom beitragenden Ionen bzw. der beteiligten Ionenkanäle zu treffen.

### 3.2.3.3 Elektroden

Zwei gewebснаhe Elektroden dienten dazu, die transepitheliale Potenzialdifferenz zu erfassen, wohingegen zwei weitere gewebส์ferne Elektroden zur Stromeinspeisung dienten. Die Elektroden bestanden aus jeweils einem Silberdraht, welcher in 1M KCl bei einer Spannung von 6 V (bei 250 mA) für 10 Sekunden chloriert wurde. Der chlorierte Draht war dann über eine Agar-KCl-Brücke mit den Ringerlösungen apikal und basolateral des



Gewebes verbunden. Hierzu wurden gekürzte gelbe Eppendorf-Pipettenspitzen verwendet, in die eine zuvor aufgekochte Mischung aus Agar-Pulver und 1 M KCl luftblasenfrei eingefüllt wurde. Hier hinein wurde der chlorierte Silberdraht gesteckt. Das System wurde mit einer abgeschnittenen Insulinspritze, welche mit 1 M KCl gefüllt war, und einem Gummistopfen verschlossen. Mit Hilfe eines Voltmeters wurde sichergestellt, dass die Eigenpotenzialdifferenz der Elektrodenpaare einen Betrag von 1 mV nicht überschritt.

### **3.2.3.4 Voltage-Clamp-Amplifier und Current-Clamp-Messmethode**

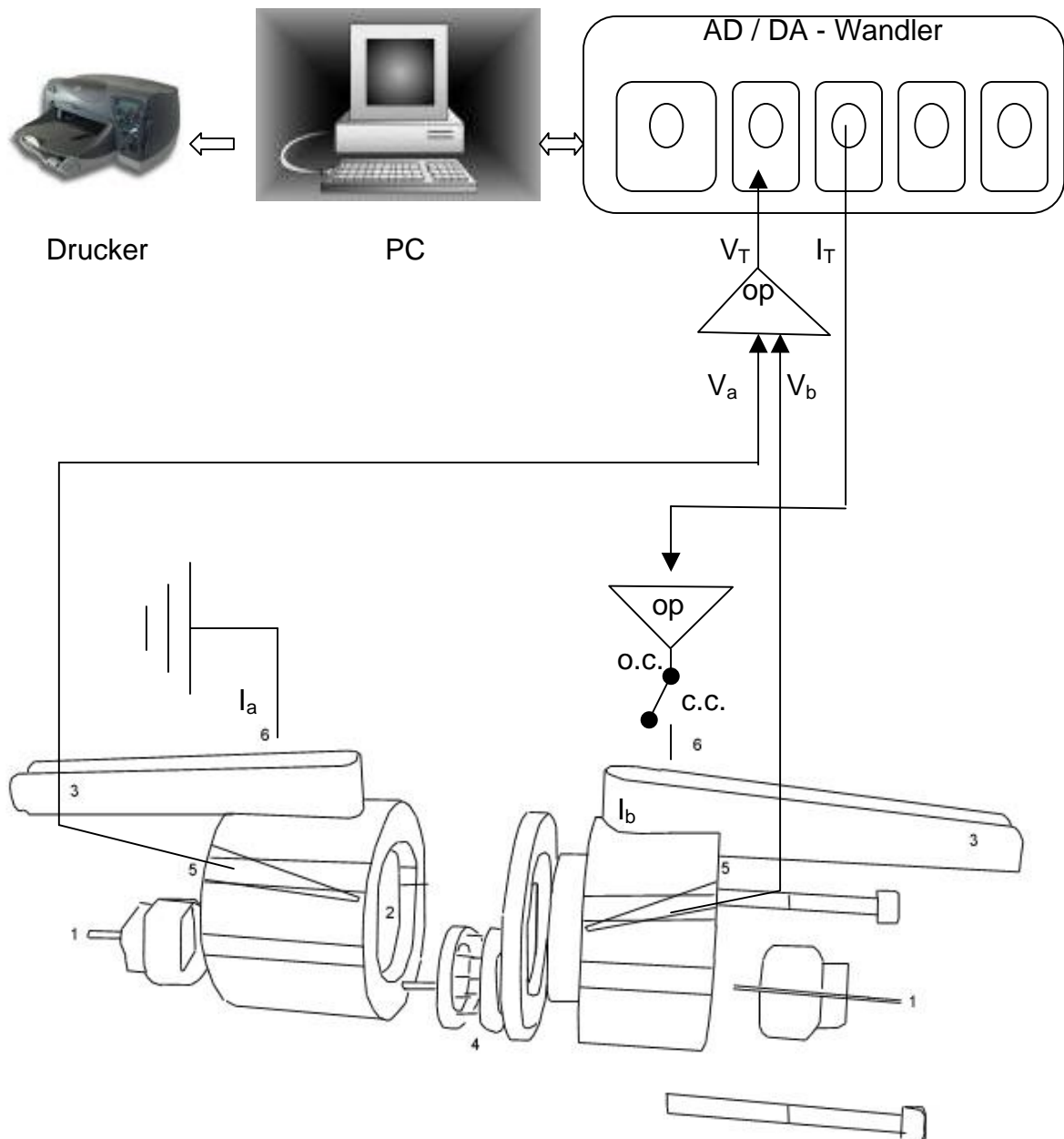
Ein Voltage-Clamp-Verstärker (W. Nagel, Universität München) ermöglichte es, dass über ein an die Ussingkammer angeschlossenes Voltmeter die transepitheliale Potenzialdifferenz über die gewebnahen Elektroden kontinuierlich gemessen wurde. Auf das Gewebe wurden im current-clamp Modus durch das Gerät über die gewebsternen Elektroden regelmäßig (alle 4 Sekunden) Stromimpulse von bekannter Größe (5  $\mu$ A) und Dauer (400 ms) appliziert. Dabei verschob sich entsprechend die Gewebspotenzialdifferenz. Zu diesen Zeitpunkten war der Strom (I) also bekannt und die Potenzialauslenkung ( $\Delta U$ ) konnte vom Gerät gemessen werden, so dass der elektrische Widerstand (R) dann vom Computer mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes errechnet werden konnte ( $R = \Delta U/I$ ). Mit Hilfe des so errechneten Widerstandes (R) und der gemessenen Potenzialdifferenz (U) konnte das Gerät alle 4 Sekunden einen virtuellen (kalkulierten) Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) berechnen ( $I = U/R$ ). Die errechneten Stromwerte stellte das Gerät als interpolierte Kurve dar. Im Gegensatz zu dem häufig verwendeten voltage-clamp-Modus, bei dem das Potenzial permanent auf 0 mV geklemmt wird, handelt es sich bei der hier angewandten current-clamp Methode um ein für das Gewebe schonenderes Verfahren.

### **3.2.3.5 Aufzeichnung der Daten**

Während der Messungen wurden Spannung, Strom und Widerstand kontinuierlich und parallel über ein MacLab Interface auf einen Computer übertragen und mit dem Chart-Programm Version 4.0.2 (beides von Analog Digital Instruments, Castle Hill, Australia) aufgezeichnet. Das Interface fungierte als Analog/Digital-Wandler (A/D-Wandler) zwischen dem Voltage-Clamp-Amplifier und dem PC. Ein spannungsgesteuerter Oszillator in diesem Gerät war dabei in der Lage, die gemessene transepitheliale Potenzialdifferenz in ein für den PC auswertbares Signal zu überführen. Im Ergebnisteil verwendete Ausschnitte von z.B. Stromkurven wurden als ASCII-Datei aus dem Messprogramm gespeichert und in das Mathematik-Programm Microcal Origin 5.0 bzw. 6.1 Professional übernommen. Es fand keine Bearbeitung der Grafiken statt, die die Ergebnisse beeinflusst hätten. Beim Vergleich der graphischen Darstellungen der Ergebnisse muss auf die unterschiedliche Skalierung der Achsen geachtet werden.

### 3.2.3.6 Vorzeichenkonvention

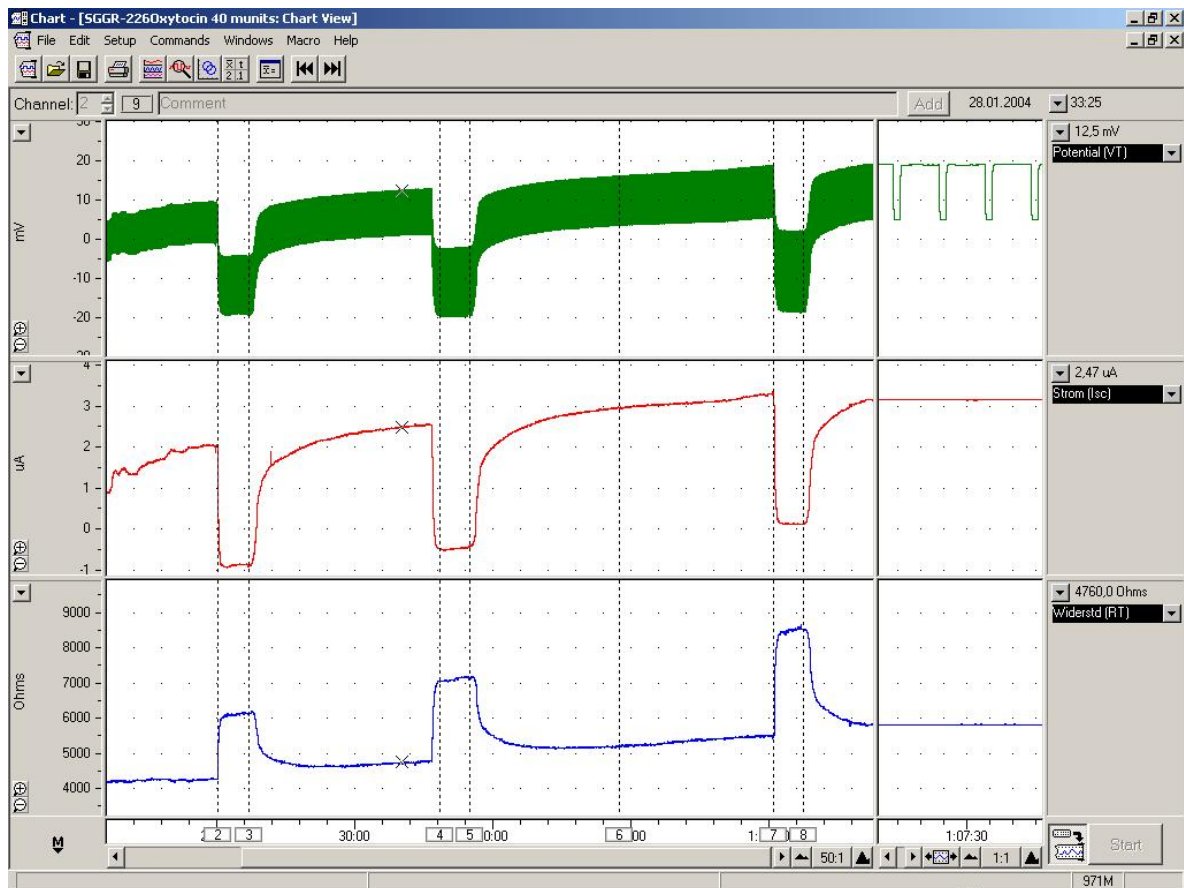
Werden positive Ladungen von der apikalen zur basolateralen Seite transportiert, so drückt sich das im Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) als positiver Wert aus. Gleiches gilt für einen Nettotransport negativer Ladungen in die Gegenrichtung. Die transepitheliale Potenzialdifferenz bezieht sich auf die Elektrode der apikalen Gewebsseite als Referenzelektrode.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der verwendeten Ussingkammer. Über zwei Zuläufe (1) gelangten die Salzlösungen in die beiden Kammerhälften (2) à 1,5 ml Kammervolumen und über die Abläufe (3) wieder aus dem System hinaus. So wurde das in einen Plastikring (4) eingespannte Gewebe mit einer Fläche von 0,5 cm<sup>2</sup> kontinuierlich von der apikalen und basolateralen Seite perfundiert. Die Spitzen der beiden Potzialelektroden (5;  $V_a$ : apikale Potzialelektrode,  $V_b$ : basolaterale Potzialelektrode,  $V_T$ : transepitheliale Potentialdifferenz) kamen direkt am Gewebe zu liegen, wohingegen die Stromelektroden (6;  $I_a$ : apikale Stromelektrode,  $I_b$ : basolaterale Stromelektrode,  $I_T$ : transepithelialer Strom) im current-clamp-Modus (o.c.: open-circuit, c.c.: current-clamp) gewebtsfern Stromimpulse abgaben. Über einen AD/DA-Wandler wurden die Daten an einen PC übermittelt und aufgezeichnet.



**Abbildung 2:** Die modifizierten Ussingkammern für die elektrophysiologischen Messungen. Jede Kammerhälfte hatte ein Volumen von 1,5 ml und die Messfläche betrug  $0,5 \text{ cm}^2$ .



**Abbildung 3:** Bildschirmdarstellung einer Messung mit dem Chart-Programm. Transepitheliale Potenzialdifferenz, Strom und Widerstand wurden über die gesamte Versuchsdauer hinweg aufgezeichnet.

### 3.2.4 Radioisotopenversuche

Radiochemische Messmethoden zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Sie basieren auf dem Einsatz von radioaktiven Isotopen. Unter Isotopen versteht man Atome ein und desselben chemischen Elementes, die sich in ihren Massenzahlen (genauer in der Neutronenzahl) unterscheiden. Radioaktive Isotope sind instabil, d.h. sie zerfallen und senden dabei Strahlen aus.

#### 3.2.4.1 verwendete Lösungen

künstliches Teichwasser mit RbCl statt KCl	NaCl	0,5 mM
(Rubidium Containing Artificial Pond-Water, $_{\text{Rb}}\text{PW}$ )	$\text{CaCl}_2$	0,4 mM
	$\text{NaHCO}_3$	0,2 mM
	RbCl	0,05 mM
	HEPES	5 mM
Regenwurm-Ringer-Lösung mit RbCl statt KCl	NaCl	71 mM
(Rb Containing Earthworm Ringer's Solution, $_{\text{Rb}}\text{ERS}$ )	RbCl	4 mM
	$\text{CaCl}_2$	1,5 mM
	HEPES	5 mM

#### 3.2.4.2 Eingesetzte Isotope

In den beschriebenen Versuchen wurde das Isotop  $^{86}\text{Rubidium}$  verwendet. Es hat eine Halbwertszeit von ca. 19 Tagen und zerfällt unter Aussendung von  $\beta$ -Partikeln. Das sind Elektronen, die ihren Ursprung im Atomkern haben und auch als „Negatronen“ bezeichnet werden.

#### 3.2.4.3 Einheiten der Radioaktivität

Die SI-Einheit für die Radioaktivität ist das Becquerel (Bq) welches die Anzahl der Zerfallsereignisse pro Zeiteinheit mit der Dimension  $[1/\text{s}]$  beschreibt. In den Effluxversuchen wurden 74 kBq  $^{86}\text{Rb}$  (entsprechend 2  $\mu\text{Ci}$ ) je 2,5 ml Kammervolumen eingesetzt.

Die alte, häufig noch verwendete Einheit ist das Curie (Ci). 1Ci entspricht der Anzahl der Kernzerfälle von 1 g Radium pro Sekunde. Mit folgender Formel lassen sich die Einheiten konvertieren:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

#### 3.2.4.4 Rubidium-Effluxversuche

Das eingesetzte  $^{86}\text{Rb}$  dient als Marker für Ionentransportmechanismen, die von Kalium benutzt werden. Das radioaktive Isotop  $^{42}\text{K}$  hat eine äußerst kurze Halbwertszeit und eignet sich daher nur begrenzt für Versuche.

Der Regenwurm wurde wie in Kapitel 3.2.1 dargestellt präpariert und in die Effluxkammern (vgl. Abbildung 4) mit Hilfe der rund um die Messöffnung vorhandenen Nadeln eingespannt. Jede Kammerhälfte hatte hier ein Volumen von 2,5 ml, welches mit modifizierter Regenwurm-Ringer-Lösung ( $_{\text{Rb}}\text{ERS}$ ) aufgefüllt wurde. In einem Teil der durchgeführten Versuche wurde das apikale Kammervolumen mit 2,5 ml modifiziertem pond-water ( $_{\text{Rb}}\text{PW}$ ) gefüllt. Die Modifikation liegt darin, dass in allen Effluxversuchen das üblicherweise in den Lösungen enthaltene Kalium durch Rubidium ersetzt wurde.

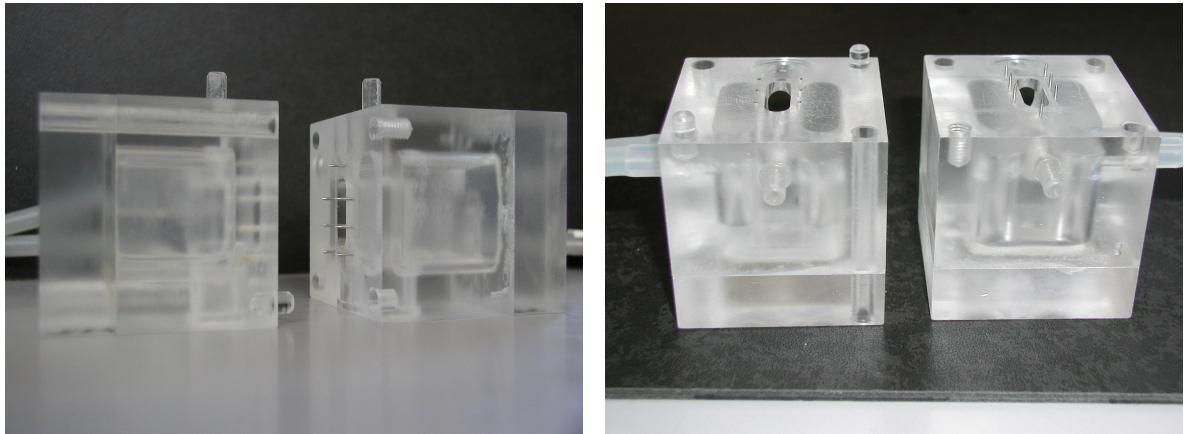
Jeder Kammerhälfte wurden 74 kBq  $^{86}\text{Rb}^+$  zugesetzt, und das Gewebe hatte 30 Minuten Zeit, das radioaktive Isotop aufzunehmen. Dann folgten 3 Waschschrte mit unmarkierter Lösung. Anschließend wurden Proben à 500  $\mu\text{l}$  (als Doppelbestimmung) aus jeder Kammerhälfte alle 6 Minuten entnommen und mit dem entsprechenden Volumen an unmarkierter Lösung aufgefüllt.

#### 3.2.4.5 Szintillationszählung

Zur Erfassung von  $\beta$ -Strahlung eignet sich besonders die Flüssigkeitsszintillation. Bei der Szintillationszählung wird das Licht gemessen, das fluoreszierende Substanzen aussenden, wenn sie durch radioaktive Strahlung angeregt werden.

Die Proben (jeweils als Doppelbestimmung à 500  $\mu\text{l}$  aus 2,5 ml Kammervolumen) wurden in Szintillationsgefäße pipettiert (Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt) mit 4 ml der Szintillationsflüssigkeit gemischt. Ein emittiertes  $\beta$ -Teilchen (Elektron) aus der Probe kollidiert nach kurzer Zeit mit einem Lösungsmittelmolekül und überträgt darauf seine Energie. Das angeregte Lösungsmittelmolekül (Singulettzustand) kann die aufgenommene Energie nach Übergang in den Triplettzustand als Licht abstrahlen (Phosphoreszenz). Ein ebenfalls im „Szintillationscocktail“ vorhandener Szintillator ist in der Lage, dieses Licht zu absorbieren und bei einer längeren Wellenlänge zu emittieren (Fluoreszenz). Dieses Fluoreszenzlicht trifft auf die Photokathode des Photomultipliers und wird dort in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Energie des anregenden  $\beta$ -Teilchens ist proportional

zur Intensität der Fluoreszenz, die auf den Photomultiplier fällt und damit zu dessen Impulshöhe.



**Abbildung 4:** Für die Effluxmessungen wurden modifizierte Ussingkammern aus Plexiglas mit einem Volumen von 2,5 ml je Kammerhälfte und einer Messfläche von 1cm<sup>2</sup> eingesetzt.

Eine Probe kann in zweifacher Weise mit dem elektronischen Impulszähler ausgezählt werden. Man kann die Zeitdauer für den Zählvorgang vorwählen oder eine bestimmte Impulszahl vorgeben, die ein Zähler erfassen muss. Der Zählvorgang ist beendet, wenn die vorgegebene Zeit vorbei ist bzw. die Impulszahl erreicht ist.

Das verwendete Messprotokoll basierte darauf, dass die Proben 5 min lang ausgezählt wurden. Zusätzlich wurde die Stabilität der Daten als Abbruchkriterium herangezogen und die Messung teilweise schon früher abgebrochen, nämlich wenn die Standardabweichung nur noch 1-2 % des Mittelwertes betrug. Zur Szintillationszählung wurde ein Gerät der Firma Packard verwendet (Tri-carb 2700 TR Liquid Scintillation Analyzer). Die gemessenen Werte (angegeben als counts per minute, cpm) wurden ausgedruckt und als dat.-Datei über einen angeschlossenen PC gespeichert.

#### 3.2.4.6 Berechnung der Efflux-Messdaten

Die Restaktivität im Gewebe direkt nach Versuche wurde bestimmt, indem das Gewebe der Messfläche (ca. 1 cm<sup>2</sup>) ausgeschnitten und kurz gespült wurde, über Nacht in 1 ml einer 0,1 M Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) bei 60 °C im Wasserbad verdaut und am darauffolgenden Tag mit 100 µl einer 1 M Natronlauge (NaOH) neutralisiert wurde. Dann wurden ebenfalls 4 ml der Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und die Gewebeproben mit den restlichen Proben im Szintillationszähler gemessen. Über eine Rückrechnung wurde aus der Restgewebeaktivität die initiale Radioaktivität im Gewebe nach Beladung mit <sup>86</sup>Rb bestimmt, indem die entnommene Strahlenmenge der einzelnen Messintervalle

aufaddiert wurde. Die gemessenen cpm jedes Messintervalls wurden dann als prozentualer Efflux der zu Beginn jeder Effluxperiode vorhandenen  $^{86}\text{Rb}$ -vermittelten Aktivität im Gewebe ausgedrückt. Es ergibt sich dadurch die Dimension  $[\% \text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}]$ . Dieser Rechenweg führt zu einer Linearisierung der Messdaten in der graphischen Darstellung.

### 3.2.5 Statistik

**Stichprobenumfang** (n)/ Anzahl der Gewebeproben (N):

Die Anzahl der Einzelversuche wird mit „n“ bezeichnet. Von jedem Regenwurm wurden zwei Gewebepreparate gewonnen und parallel in zwei Ussingkammern gemessen. Die Anzahl der eingesetzten Einzelgewebeproben in einer Versuchsreihe wird mit „N“ bezeichnet.

**arithmetischer Mittelwert** ( $\langle x \rangle$ ):

Die angegebenen Mittelwerte sind arithmetische Mittelwerte und berechnen sich aus der Summe aller Daten innerhalb der Stichprobe geteilt durch die Anzahl der Einzelwerte.

$$\langle x \rangle = 1/n \sum x_i; i = 1, 2, \dots, n$$

**Varianz** ( $s^2$ ):

Die Varianz als ein Maß für die Streuung einer Variablen (x) basiert auf der Summe der quadrierten Abweichungen (SAQ) jedes Variablenwertes vom arithmetischen Mittel ( $\langle x \rangle$ ) über alle Untersuchungseinheiten (n). N entspricht hier der Anzahl der Freiheitsgrade.

$$s^2 = \text{SAQ}/N; N = n-1; \text{SAQ} = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

**Standardabweichung** (s):

Die Standardabweichung ergibt sich durch Radizieren der Varianz;  $s = \sqrt{s^2}$ .

**Standardfehler des Mittelwertes** (standard error of the mean, SEM,  $s(\langle x \rangle)$ ):

Der Standardfehler errechnet sich aus der Standardabweichung dividiert durch die Wurzel der Anzahl der Einzelversuche;  $s(\langle x \rangle) = s / \sqrt{n}$ . Alle Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben, wobei der SEM als y-Fehlerbalken in Balkendiagramme eingefügt wurde. Wurden zur Darstellung von Ergebnissen in Form eines Balkendiagramms die Mittelwerte zweier Messreihen (z.B. Versuchsgruppe und Kontrollgruppe) mit ihrem jeweiligen Fehler voneinander abgezogen (vgl. Abb. 37 und 38 Oxytocin), so ergab sich der vereinigte Fehler durch die Anwendung des Gauss'schen Gesetzes der summativen Fehlerfortpflanzung. Dabei wird die Wurzel aus der Summe der



Varianzen der beiden Messreihen gezogen und die so ermittelte summativ Standardabweichung durch die Summe der Anzahl der Einzelversuche beider Messreihen ( $n_1 + n_2$ ) geteilt.

**Irrtumswahrscheinlichkeit (p):**

Die Ergebnisse wurden als signifikant ausgewiesen, wenn  $p \leq 0,05$  betrug, d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag. Das war gegeben, wenn der gefundene Wert für t im t-Test bzw. der gefundene Wert für F in der Varianzanalyse den kritischen Wert auf dem 95 %igen Signifikanzniveau erreichte bzw. überschritt.

**Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA):**

Beim Vergleich von zwei oder mehr Mittelwerten gleichartiger Messreihen wurde die Varianzanalyse angewandt.

**gepaarter t-Test nach Student:**

Um zu untersuchen, ob eine Substanz einen signifikanten Einfluss auf den Strom ( $I_{sc}$ ) hatte, wurde der gepaarte t-Test (nach Student) angewandt, da der Ausgangswert im  $I_{sc}$  und der  $I_{sc}$ -Wert nach Applikation der Substanz sich abhängig voneinander verhalten. Es wurde die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Elementen eines Wertepaares auf den Wert Null getestet. Der t-Wert errechnete sich aus dem Quotienten aus der Standardabweichung der Differenzen und dem Standardfehler der Differenzen.

**Test auf Normalverteilung:**

Die Qualität der Normalverteilung der ermittelten Messwerte wurde mit dem **Probit-Plot** überprüft (vgl. hierzu Kap. 4.3.1).

**Michaelis-Menten-Kinetik:**

Die Dosis-Wirkungskurven der pharmokokinetischen Untersuchungen wurden als hyperbole Kurven nach der Formel der Michaelis-Menten-Kinetik berechnet:

$$y = P_1 x / (P_2 + x)$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologie der Regewurmhaut

#### 4.1.1 Lichtmikroskopische und fluoreszenzoptische Ergebnisse am Leibesschlauch

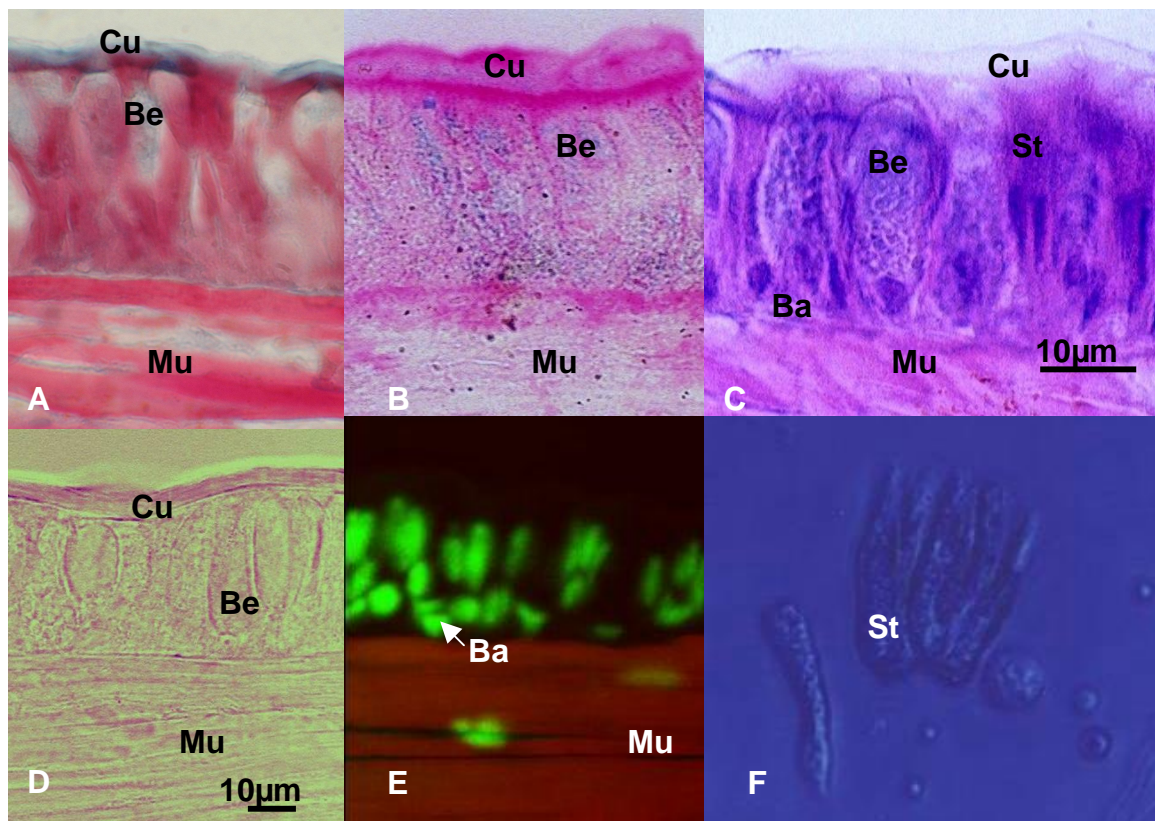
Die Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbung der Haut des in der vorliegenden Arbeit für Versuche eingesetzten Versuchstiers (*Lumbricus terrestris*) zeigt im Querschnitt ein einschichtiges Epithel, und man kann zunächst drei Zelltypen unterscheiden (Abb. 5 C):

- Basalzellen,
- Stützzellen
- Becherzellen

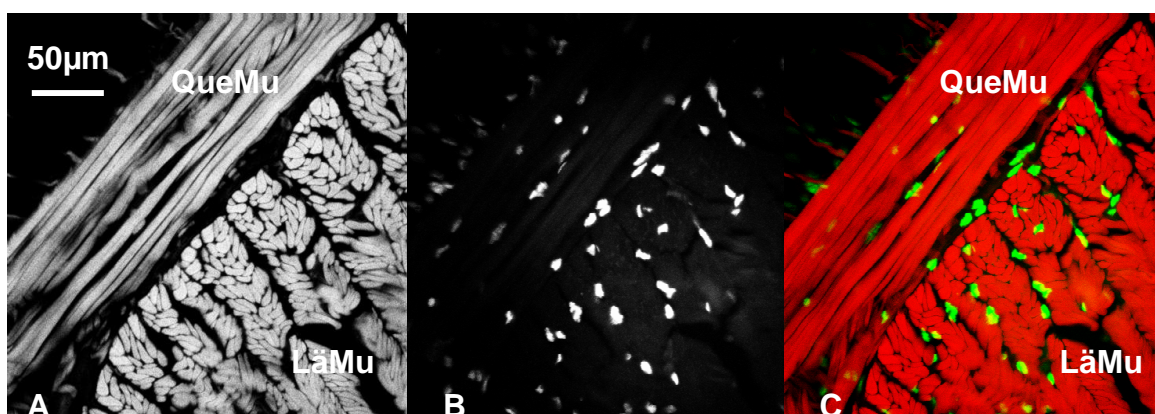
Die Becherzellen sind etwa 10 µm breit und 30 µm hoch, die Stützzellen sind etwas schmaler. Bereits im ungefärbten Gefrierschnitt (Abb. 5 D) ist erkennbar, dass etwa jede zweite Epithelzelle eine Becherzelle ist. Diese Zellen sind gefüllt mit Schleim, der sich in der Azan-Färbung blau darstellte (Abb. 5 B), in der Goldner-Färbung grün und in der PAS-Reaktion positiv erschien (ohne Abb.).

Gefolgt wird das Epithel auf der basolateralen Seite von Quer- und Längsmuskelschichten. Diese färbten sich mit Phalloidin-FITC deutlich an und sind in Abb. 5 E und 6 C rot dargestellt. In diesen fluoreszenzoptischen Bildern, die mit Hilfe des Laser-Scanning-Konfokalmikroskops gemacht wurden, sind die Kerne der Epithel- und Muskelzellen gegengefärbt und grün dargestellt. Es wird deutlich, dass die Kerne der Basalzellen und die der restlichen Epithelzellen auf unterschiedlichen Ebenen liegen, was dem Epithel an sich ein pseudo-mehrschichtiges Aussehen verleiht.

Weiterhin ist eine dem Epithel auf der apikalen Seite aufliegende Cuticula als amorphe, etwa 3-4 µm dicke Schicht erkennbar. In der Masson-Färbung (Abb. 5 A) erscheint die Cuticula blau gefärbt und in der Elastica v. Gieson-Färbung rot (ohne Abb.), was beides auf eine kollagene Natur der Fasern schließen lässt.



**Abbildung 5:** Darstellung des histologischen Aufbaus des Epithels der Regenwurmhaut im lichtmikroskopischen Bild. A: Masson-Färbung, B: Azan-Färbung, C: H.E.-Färbung, D: ungefärbtes Präparat, E: Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff H33342 (grün dargestellt) sowie Färbung der Muskulatur mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (rot dargestellt), F: isolierte Epithelzellen der Regenwurmhaut. A-C: Objektiv 63x Öl, Ba: Basalzellen, Be: Becherzellen, Cu: Cuticula, Mu: Muskelzellen, St: Stützzen



**Abbildung 6:** Darstellung der Quer- und Längsmuskulatur des Leibesschlauchs des Regenwurms. A: Färbung der Muskulatur mit dem FITC-gekoppeltem Phalloidin, B: Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff H33342, C: Überlagerung von A und B (Zellkerne grün dargestellt, Muskulatur rot dargestellt). A-C: 63x Öl Laserkonfokal, LäMu: Längsmuskulatur, QueMu: Quermuskulatur

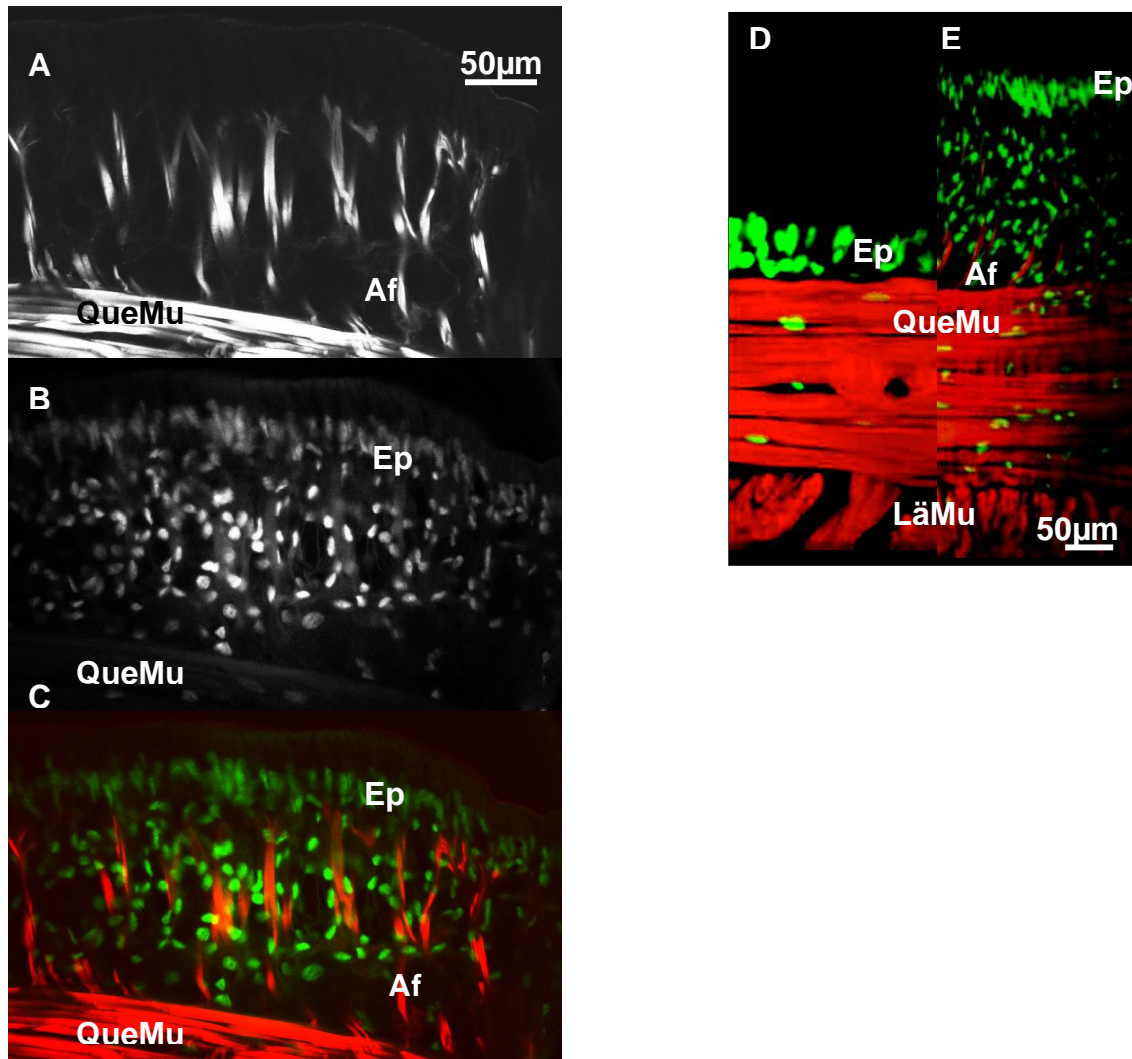
### **4.1.2 Fluoreszenzoptische Ergebnisse am Clitellum**

In der Folge wurden fluoreszenzoptische Aufnahmen mit dem Laser-Scanning-Konfokalmikroskop speziell vom Clitellum (Drüsengürtel zur Abscheidung des Kokons) gemacht. Hierbei fiel eine der Muskulatur aufsitzende mehrschichtige Zellschicht auf, wie sie in den sonstigen Körperabschnitten cranial sowie caudal des Clitellums nicht zu finden war. Orthogonal zur Quermuskulatur fanden sich Fasern, die mit Phalloidin-FITC anfärbbar waren (Abb. 7). Es fällt hier allerdings im Vergleich zu den Längs- und Quermuskelschichten eine geringe Dichte an diesen Aktinfasern und eine hohe Dichte an Zellkernen auf. Den Abschluss zur Körperaußenseite bildet auch im Clitellum wiederum ein einschichtiges Epithel mit aufliegender Cuticula.

### **4.1.3 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse**

Die histologischen Schnitte der Regenwurmhaut lassen erkennen, dass die Epidermis des Regenwurms aus einem einschichtigen Epithel mit aufgelagerter kollagener Cuticula besteht. Ein pseudo-mehrschichtiges Aussehen kommt durch die Verteilung der Zellkerne auf zwei Ebenen zustande. Etwa jede zweite Zelle ist eine Becherzelle, welche mit Schleim gefüllt ist. Die Basalzellen reichen nicht bis zur Cuticula, jedoch sitzen alle Zellen des Epithels der Basallamina auf, die sich nach innen anschließt und das Epithel von den angrenzenden Ring- und Längsmuskelschichten trennt. Fibroblasten sind beim Regenwurm nicht beschrieben. Alle in der Folge beschriebenen Untersuchungen wurden an diesem Gewebe gemacht.

Im Gegensatz zum restlichen Leibesschlauch liegen der Quermuskulatur der Clitellumregion mehrere Zellschichten auf, die von Aktinfasern durchzogen sind. Auch hier bildet ein einschichtiges Epithel den Abschluss nach außen.



**Abbildung 7:** Fluoreszenzoptische Färbung der Clitellumregion des Regenwurms. A: Darstellung von Aktin mit Hilfe von Phalloidin-FITC, B: Kernfärbung mit H33342, C: Überlagerung von A und B (FITC rot dargestellt, H33342 grün dargestellt), D und E: Vergleich der Haut der Clitellumregion (E) mit der des Leibesschlauches caudal des Clitellums. Es fallen deutlich mehr Zellschichten apikal der Muskulatur im Clitellum als an der übrigen Haut auf. A-E: 63x Öl Laser-konfokal, Af: Aktinfasern, Ep: Epithel, LāMu: Längsmuskulatur, QueMu: Quermuskulatur.

## 4.2 Elektrophysiologische Eigenschaften der Regenwurmhaut

### 4.2.1 Die Grundparameter in Strom, Widerstand und Spannung

Um die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der Regenwurmhaut zu beschreiben, wurden zunächst die Anfangswerte des transepithelialen Stroms ( $I_{sc}$ ), der transepithelialen Potenzialdifferenz ( $V_t$ ) sowie des Widerstandes ( $R_t$ ) ermittelt, nachdem das Gewebe ausreichend Zeit hatte, sich zu equilibrieren ( $n = 120$ ). Daraufhin wurden die statistischen Maßzahlen für diese Parameter bestimmt (Tab. 1).

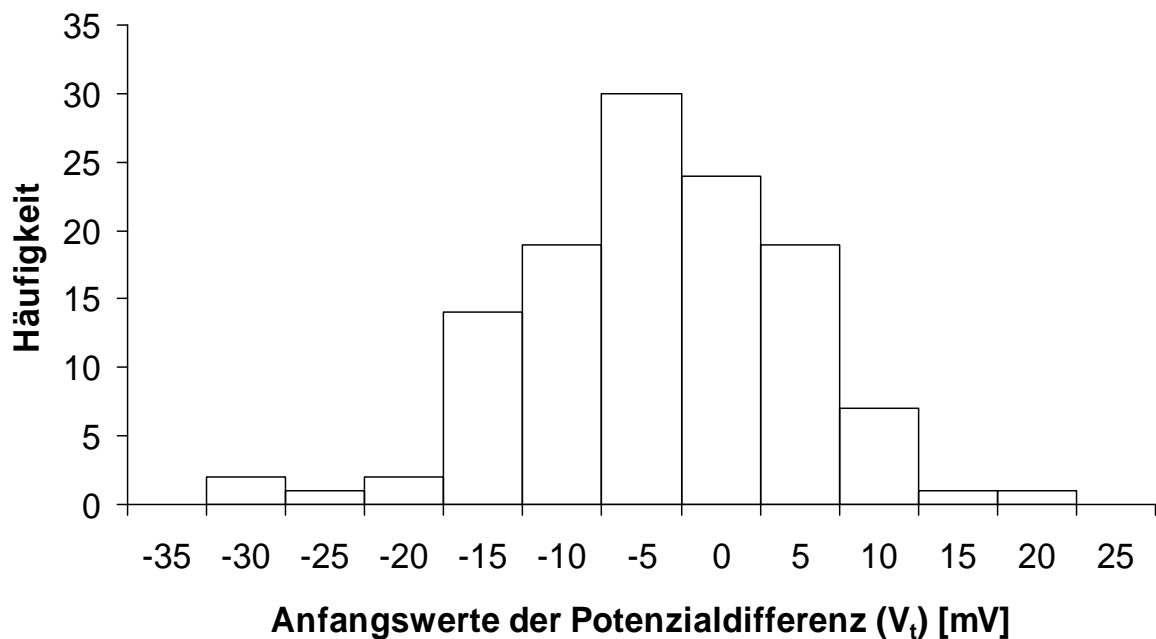
**Tabelle 1:** Die statistischen Grundparameter der Anfangswerte in Strom, Potenzialdifferenz und Widerstand zu Beginn der einzelnen Experimente ( $n = 120$ )

	Potenzialdifferenz ( $V_t$ )	Strom ( $I_{sc}$ )	Widerstand ( $R_t$ )
Einheit	mV	$\mu A/cm^2$	Ohm·cm <sup>2</sup>
Minimalwert	-33,7	-3,84	1.140
Maximalwert	19,9	1,98	24.444
Spanne	53,6	5,82	23.304
arithmetischer Mittelwert	-6,31	-0,69	11.593
Standardabweichung	8,65	0,98	5.311
SEM	0,79	0,09	485
Stichprobenumfang (n)	120	120	120

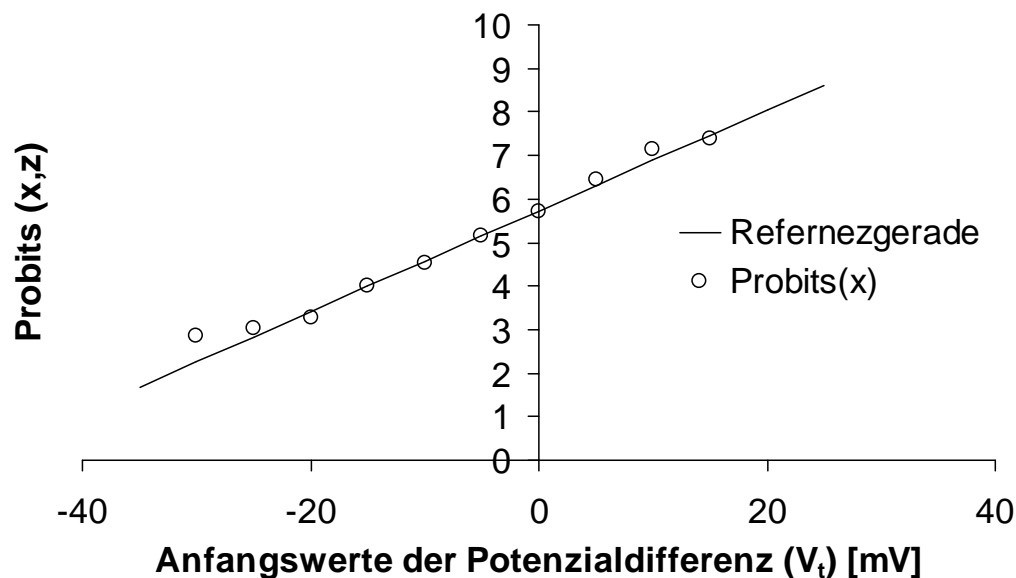
Da die Verwendung des arithmetischen Mittelwertes sowie der üblichen Streumaße wie Standardabweichung oder Standardfehler nur korrekt ist, wenn die Daten normalverteilt sind, wurde die Qualität der Normalverteilung der gemessenen Parameter mit dem sogenannten Probit-Plot überprüft (Abb. 9). Hierzu trägt man die Probite der Messwerte (Ordinate) gegen die Messwerte (Abszisse) auf. Im Fall einer Normalverteilung der Werte ergibt sich eine Gerade. Als Referenzgerade dienen die z-transformierten Werte von  $x$ ,  $f(z)+5$ . Die Rechnungen ergaben, dass die untersuchten Parameter sowohl von der Potenzialdifferenz, als auch vom Strom und vom Widerstand ausreichend normalverteilt waren. Aufgrund dieser Tatsache können demnach die üblichen statistischen Kennzahlen die Lage und die Streuung der Stichprobe widerspiegeln.

Verschiedene Substanzen hatten einen signifikanten Einfluss auf diese Ausgangsparameter. Aufgrund der Wirkung unterschiedlicher Pharmaka auf bestimmte Ionenkanäle, -transporter und -pumpen änderten sich Strom, Widerstand und transepitheliale Potenzialdifferenz des untersuchten Gewebes. Die Ergebnisse der Versuchsreihen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. Vor jedem Versuch hatte das Integument Zeit, in der Ussingkammer unter apikalen PW und basolateralen ERS-

Bedingungen ein stabiles Plateau im  $I_{sc}$  auszubilden [zur Begründung der anisoosmotischen Bedingungen (vgl. Kap. 5.1.2)].



**Abbildung 8:** Häufigkeitsverteilung der Anfangswerte der transepithelialen Potenzialdifferenz [mV] zu Beginn der einzelnen Experimente ( $n = 120$ ).



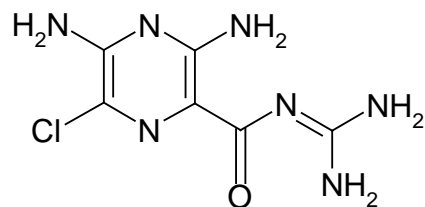
**Abbildung 9:** Probit-Plot für den Test auf Normalverteilung am Beispiel der ermittelten Anfangswerte der Potenzialdifferenz. Die Probits von  $x$  wurden für die ermittelten Summenprozentage berechnet. Die Probits für die Referenzgerade sind gleich der  $z$ -Transformation von  $x$ ,  $f(z)+5$ .

## 4.2.2 Charakterisierung des Natriumtransportes

Nachdem vorangegangene Versuche gezeigt hatten, dass der Transport von Natriumionen der dominante elektrogene Transportvorgang bei der Generation der transepithelialen Potenzialdifferenz über das Integument von *Lumbricus terrestris* war (Krumm 2002), war zu untersuchen, welche Transportmechanismen hierbei eine Rolle spielen. Das untersuchte Gewebe ist mit einem durchschnittlichen Gewebswiderstand zu Versuchsbeginn von 11.593 Ohm·cm<sup>2</sup> (Tab. 1) ein sehr dichtes Epithel. Von anderen hochohmigen Geweben, wie z.B. der Froschhaut ist bekannt, dass die Natriumabsorption vorwiegend über sogenannte epitheliale Natriumkanäle (ENaC) erfolgt (Ussing and Zerahn 1951).

### 4.2.2.1 Wirkung von Amilorid und ausgewählten Analoga auf den Natriumstrom

Amilorid ist in mikromolaren Dosen ein spezifischer Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC). Das in den Versuchen eingesetzte Amilorid ist chemisch ausgedrückt N-Amidino-3,5-Diamino-6-Chloro-Pyrazin-Carboxamid. Das Molekül hat einen Durchmesser von 4-5 Å und lässt sich mit folgender Strukturformel darstellen:



**Formel 1:** Strukturformel des Amilorids, welches ein Pyrazinoylguanidin ist.

Die Basizität der Guanidingruppe ist dabei verantwortlich für die biologische Aktivität des Moleküls. Bei physiologischem pH liegt die Guanidingruppe protoniert vor. Für die Wirksamkeit der Substanz als Inhibitor des ENaC ist es essentiell, dass sich das Molekül als Kation verhält. Bei Amilorid mit einem pK'-Wert von 8,4 ist dies bei physiologischem pH der Fall. Etwas anders verhält es sich mit Analogen, die niedrigere pK'-Werte aufweisen. Hieraus leitet sich unter anderem eine unterschiedliche Wirksamkeit bei gegebenem pH ab. Versuche an der Regenwurmhaut ergaben im leicht sauren Bereich (pH 7,0) einen stabileren Stromverlauf und eine bessere Amiloridantwort als bei einem pH von 7,4. Auch im distalen Nierentubulus und im Sammelrohr der Vertebratenniere liegt der Harn-pH im leicht sauren Bereich, dem die luminalen epithelialen Natriumkanäle in diesem Gewebe ausgesetzt sind. Hier ist der Angriffsort für Amilorid, wenn es als diuretisches Medikament z.B. beim Menschen eingesetzt wird.

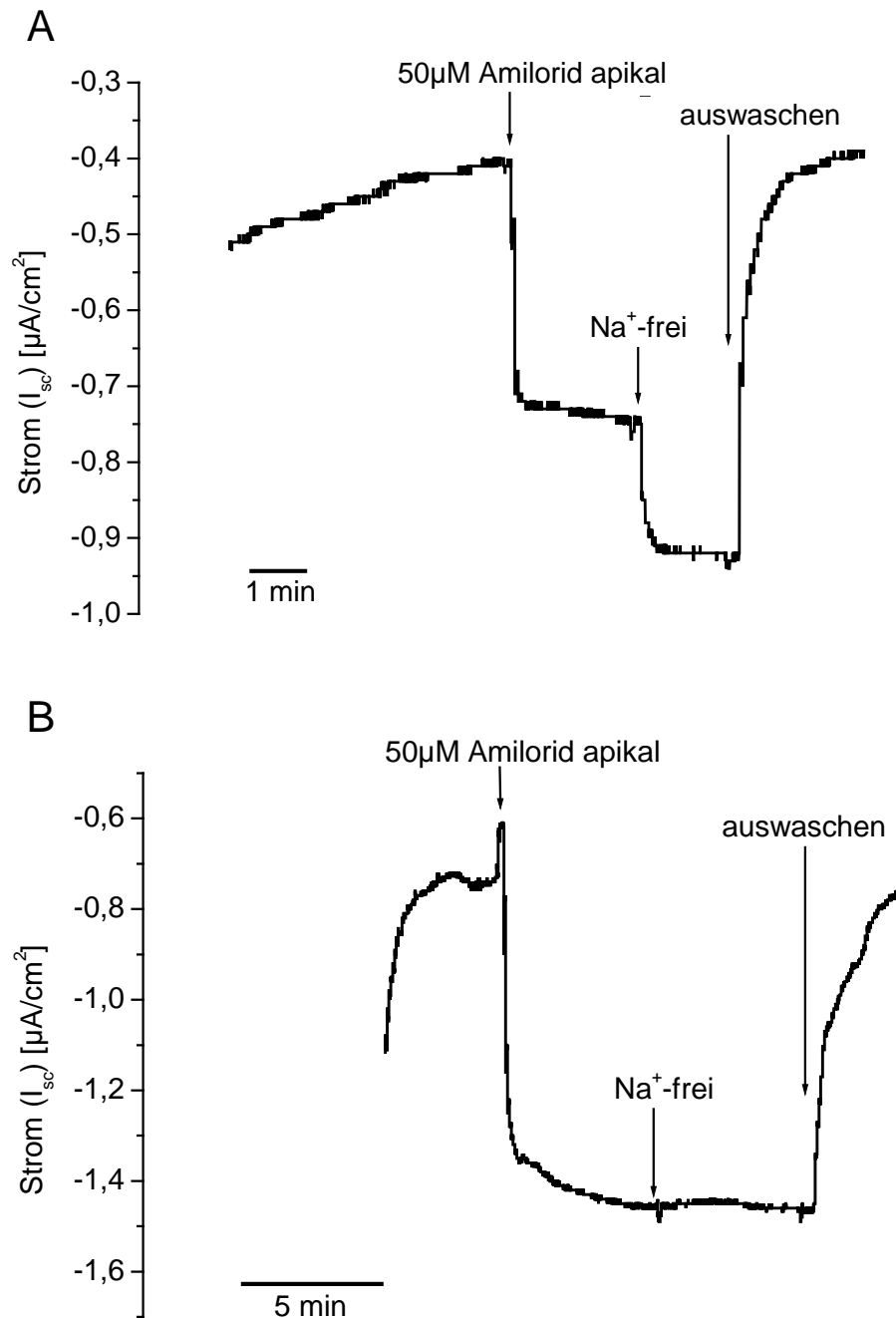


Es zeigte sich, dass der größte Teil des Natriumstroms amiloridsensitiv war, doch in einigen Versuchen sank der Strom, nachdem er sich durch die Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Amilorid auf einem niedrigeren Level stabilisiert hatte, durch Entzug von Natrium aus der apikalen Lösung noch einmal. Der Amilorideffekt auf den Kurzschlussstrom ( $I_{\text{sc}}$ ) war stets reversibel. Durch Auswaschen der Substanz mit pond-water (PW) strebte der  $I_{\text{sc}}$  seinem Ausgangsniveau wieder zu. In einigen Fällen war der amiloridsensitive Strom ( $I_{\text{amilo}}$ ) jedoch gleich dem Gesamt-Natriumstrom. Umsteigen auf Natrium-freie Lösung bewirkte dann keine weitere Senkung des  $I_{\text{sc}}$  (Abb. 10).

Die Höhe des amiloridsensitiven Stroms wurde bestimmt als Differenz des Messwertes direkt vor Amiloridgabe (im Plateau) und des Messwertes nach erneuter Stabilisierung des Stroms nach der Amiloridgabe. In 83 ausgewerteten Versuchen zeigte sich bei apikaler Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Amilorid eine durchschnittliche Erniedrigung im Strom um 0,64  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , wobei die Ergebnisse zwischen 0,01  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und 2,31  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  als Extremwerte schwanken. Es wurde jeweils die erste Amiloridantwort unter Standardbedingungen eines jeden Experiments ausgemessen. Die durchschnittliche Änderung der Potenzialdifferenz lag bei einer Senkung um 8,25 mV und der Widerstand stieg im Mittel um 2135  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$  an. Die Qualität der Normalverteilung wurde mit dem Probit-Plot überprüft (vgl. hierzu auch Kap. 4.3.1). Hierbei wurde festgestellt, dass die Messwerte ausreichend normalverteilt waren, so dass die üblichen Parameter wie arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung bzw. SEM die Lage und die Streuung der Stichprobe widerspiegeln konnten.

**Tabelle 2:** Statistische Auswertung der jeweils ersten Amiloridreaktion im Experiment ausgedrückt als Änderung in Potenzialdifferenz, Strom bzw. Widerstand. Ein negatives Vorzeichen bedeutet ein Abfallen der jeweiligen Kurve.

	$\Delta$ Potenzial ( $\Delta V_t$ )	$\Delta$ Strom ( $\Delta I_{\text{sc}}$ )	$\Delta$ Widerstand ( $\Delta R_t$ )
Einheit	mV	$\mu\text{A}/\text{cm}^2$	$\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$
Minimalwert	0	-0,01	-2.266
Maximalwert	-26,5	-2,31	+9.906
Spanne	26,5	2,30	12.172
arithmetischer Mittelwert	- 8,25	- 0,64	+ 2.135
Standardabweichung	5,58	0,42	2.248
Standardfehler (SEM)	0,61	0,05	247
Stichprobenumfang (n)	83	83	83

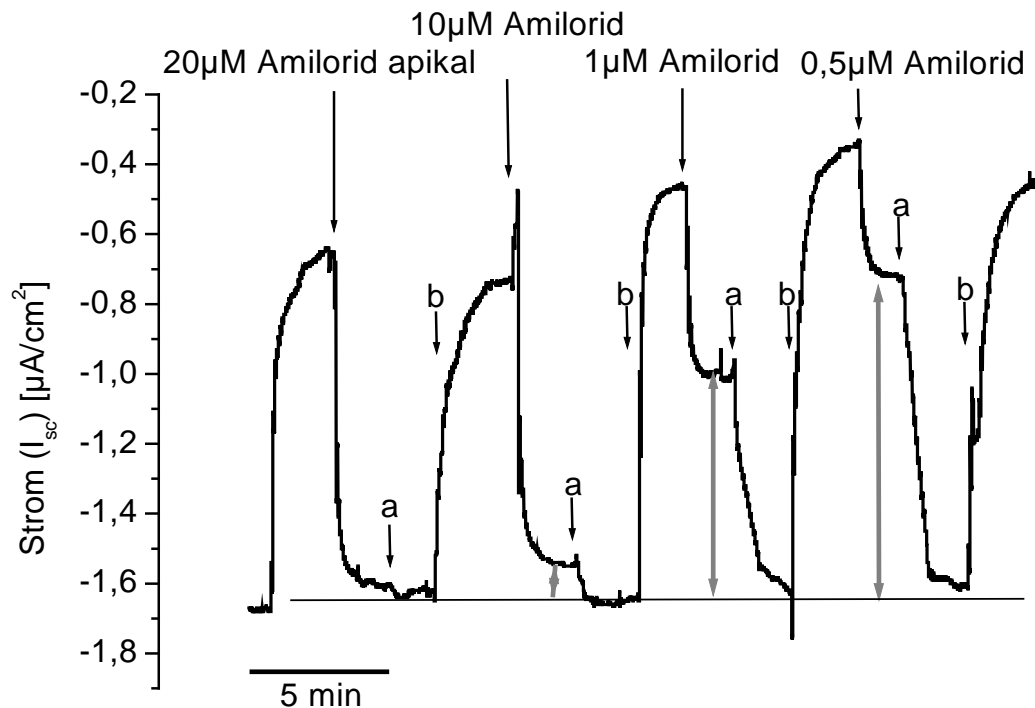


**Abbildung 10:** Die apikale Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Amilorid führte stets zu einer Erniedrigung des  $I_{sc}$ . Ein Umsteigen auf Natrium-freie Lösung auf der apikalen Seite konnte eine weitere Senkung des Stroms zur Folge haben (A), aber das war nicht in allen Experimenten der Fall (B). a: Natrium-freies PW, b: apikales Auswaschen mit PW

In der Folge wurden pharmakokinetische Untersuchungen mit Amilorid und drei seiner Analoga gemacht und auf diesem Wege die halbmaximalen Hemmkonzentrationen jener Substanzen auf den  $I_{sc}$  ermittelt. Dies erlaubt im Weiteren einen Vergleich zwischen dem Invertebratengewebe und Epithelien z.B. von Wirbeltieren.

#### 4.2.2.2 Amilorid-Sensitivität

Um die Spezifität von Amilorid als Blocker des epithelialen Natriumkanals am Integument des Regenwurms zu testen, und um die Abhängigkeit des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) von der Amiloridkonzentration zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen dieser Substanz zur apikalen Lösung gegeben. Hierbei zeigte sich deutlich eine Dosisabhängigkeit der Amilorid-Wirkung auf den Strom und im Besonderen auf den Gesamtnatriumstrom (Abb. 11)

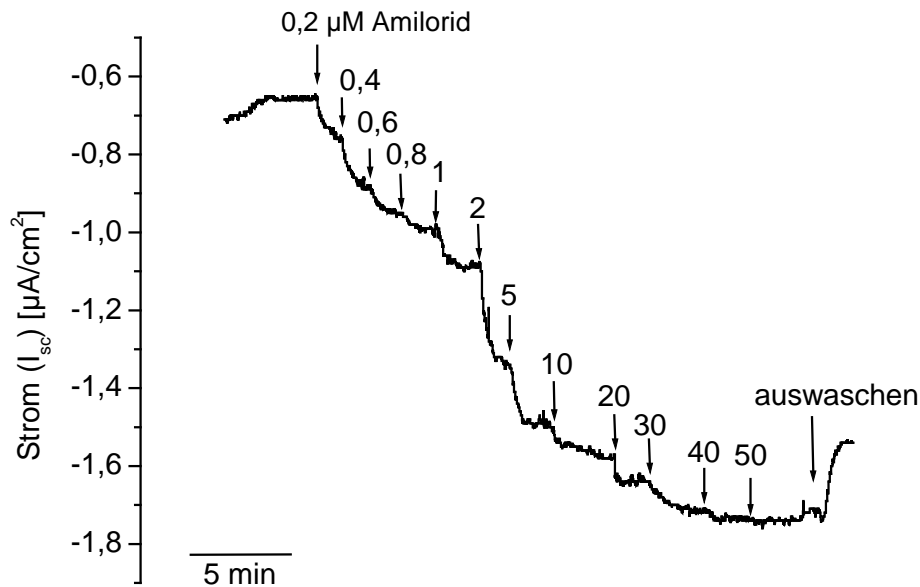


**Abbildung 11:** Der hemmende Effekt von Amilorid auf den Gesamt-Natriumstrom sank mit fallenden Konzentration. Je größer die amiloridbedingte Stromsenkung war, desto geringer war der durch Natrium-freie Lösung erzielbare Effekt (Doppelpfeile). a: Natrium-freies PW apikal, b: apikales Auswaschen mit PW.

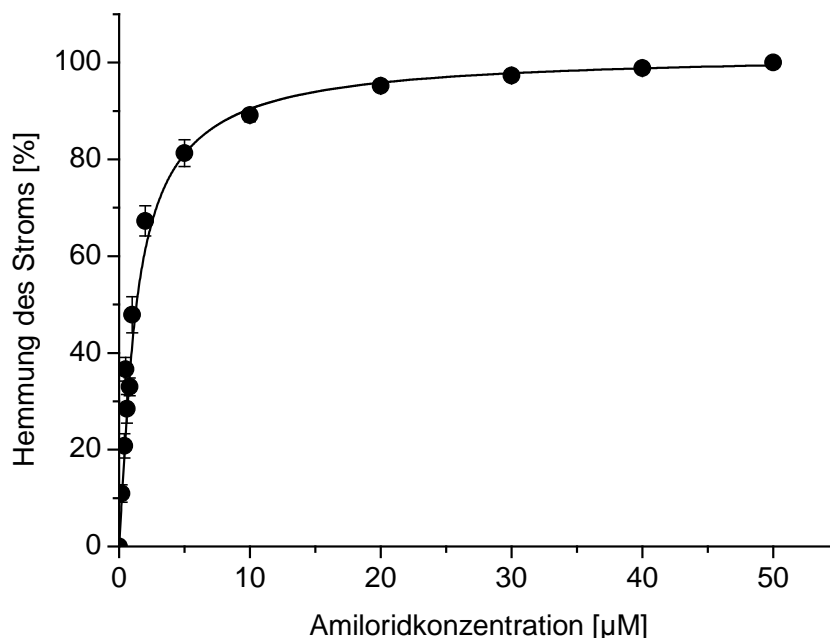
Abbildung 12 illustriert beispielhaft den sukzessiven Abfall des  $I_{sc}$  bei steigender Amiloridkonzentration im apikal applizierten PW. Basolateral wurde mit Regenwurm-Ringer Lösung (ERS) perfundiert. Das Kalium-sparende Diuretikum wurde in Konzentrationen zwischen 0,2  $\mu$ M und 100  $\mu$ M eingesetzt ( $n = 14$ ), wobei jedoch eine Gabe von mehr als 50  $\mu$ M Amilorid keine weitere Senkung des  $I_{sc}$  bewirkte. Höhere Dosen hatten eine Gegenregulation des Gewebes zur Folge, und der Strom stieg wieder an (nicht dargestellt).

Zur Erstellung einer Amilorid-Kinetik wurde mit Hilfe der sich so ergebenden Treppenkurven die Hemmung des Stroms in Prozent des totalen amiloridsensitiven Stroms dargestellt. Die im jeweiligen Versuch ermittelte maximale Hemmung wurde 100 %

gleichgesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 14$ ). Die Werte wurden in einem Graphen gegeneinander aufgetragen wodurch sich eine Hyperbel ergab (Abb. 13). Mit Hilfe der Gleichung der Michaelis-Menten-Kinetik ließ sich dann aus diesen hyperbolen Kurven die halbmaximale Hemmkonzentration der Testsubstanz berechnen, und die lag für Amilorid bei  $K_{1/2} = 1,28 \pm 0,08 \mu\text{M}$  an diesem Gewebe.



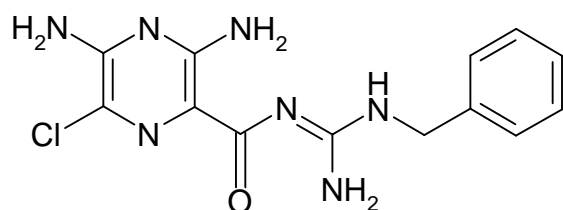
**Abbildung 12:** Verlauf des  $I_{sc}$  bei sukzessiver Erhöhung der apikalen Amiloridkonzentration auf Regenwurmhaut .



**Abbildung 13:** Dosis-Wirkungs-Beziehung von Amilorid auf den  $I_{sc}$ . Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Hemmung des amiloridsensitiven Stroms bei verschiedenen Konzentrationen der Substanz. Die Kurve entspricht einer Hyperbel nach der Formel der Michaelis-Menten-Kinetik (Kap. 3.2.5) mit  $K_{1/2} = 1,28 \pm 0,08 \mu\text{M}$ .

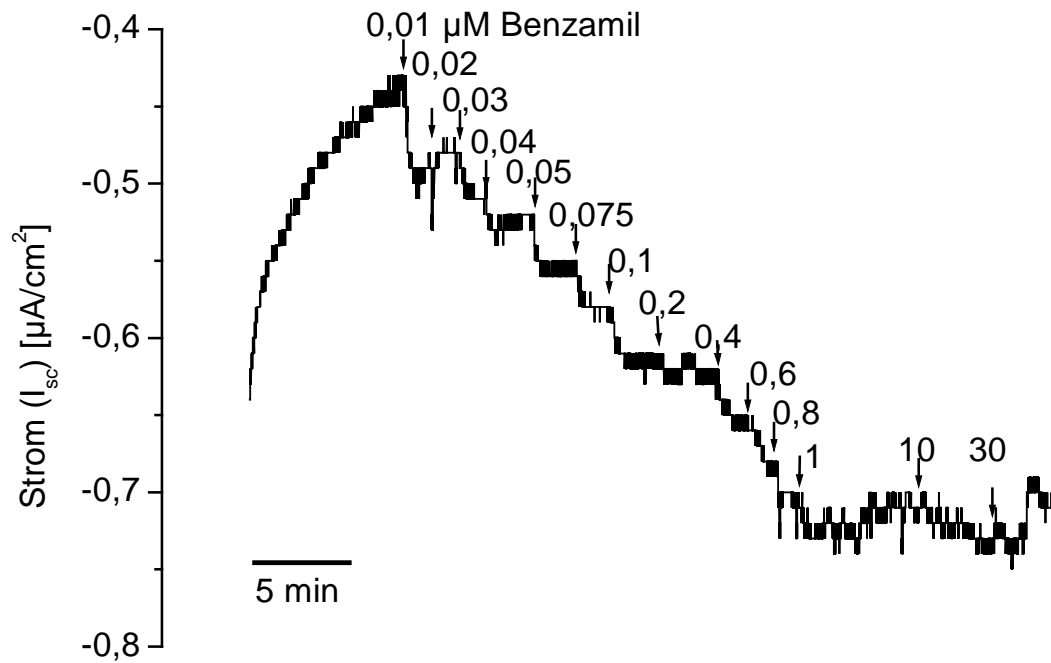
### 4.2.2.3 Benzamil-Sensitivität

Benzamil ist ein Akronym für N-(Benzylamidino)-3,5-diamino-6-Chloropyrazin-Carboxamid. Es handelt sich um ein Analog des Amilorids, welches einen Benzylrest an der terminalen Aminogruppe der Guanidingruppe enthält. Die Wirkung von Benzamil auf den  $I_{sc}$  wurde ebenso wie die Wirkung des Amilorids untersucht. Auch hier wurde die Konzentration der Substanz auf der apikalen Gewebsseite sukzessiv erhöht, was zu einer schrittweisen Depression der Stromkurve führte (Abb. 14).

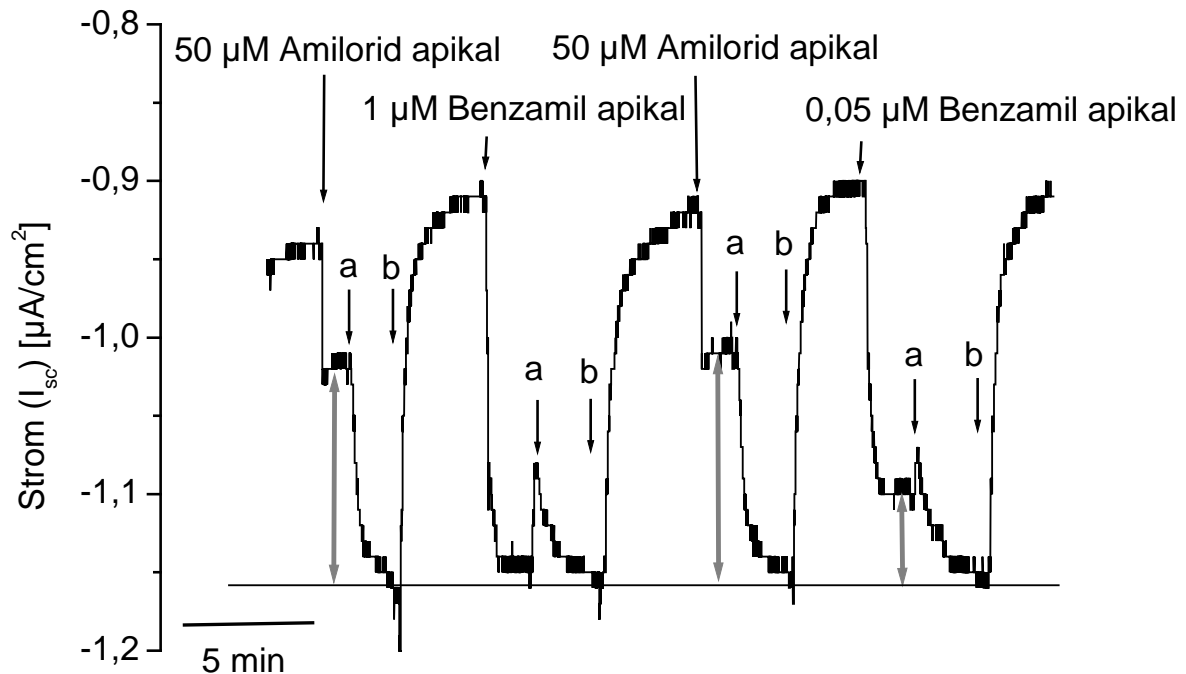


**Formel 2:** Strukturformel des Benzamils, welches gegenüber Amilorid zusätzlich einen Benzylrest an der terminalen Aminogruppe der Guanidingruppe aufweist.

Es wurden die relativen Werte der Hemmung des  $I_{sc}$  als Prozentangaben gegen die jeweiligen Benzamilkonzentrationen aufgetragen ( $n = 16$ ). Der sich aus diesen Werten ergebende Graph stellte wieder eine Hyperbel dar (vgl. Abb. 19 A), die jedoch einen deutlich steileren Anfangsverlauf als bei der Amiloridkinetik nahm. Die halbmaximale Hemmkonzentration lag demnach sehr viel niedriger und betrug im vorliegenden Fall  $K_{1/2} = 0,06 \pm 0,006 \mu\text{M}$ . Benzamil war schon in niedrigen Dosierungen in der Lage, nahezu den gesamten Natriumstrom zu hemmen, wohingegen durch Amilorid nur ein Teil blockiert wurde (Abb. 15).



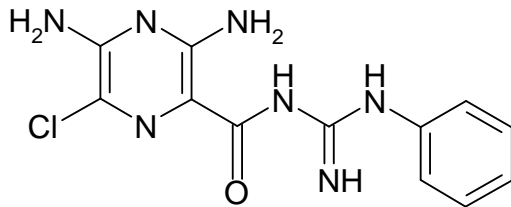
**Abbildung 14:** Steigende Benzamilkonzentrationen im apikalen PW bewirkten eine schrittweise Depression des  $I_{sc}$ .



**Abbildung 15:** Vergleich zwischen der Wirkung von Amilorid und seinem Analog Benzamil auf den Natriumstrom. Die grauen Doppelpfeile demonstrieren die Höhe des Rest-Natriumstroms nach Gabe einer der Testsubstanzen. a: Natrium-freies PW apikal, b: apikales Auswaschen mit PW

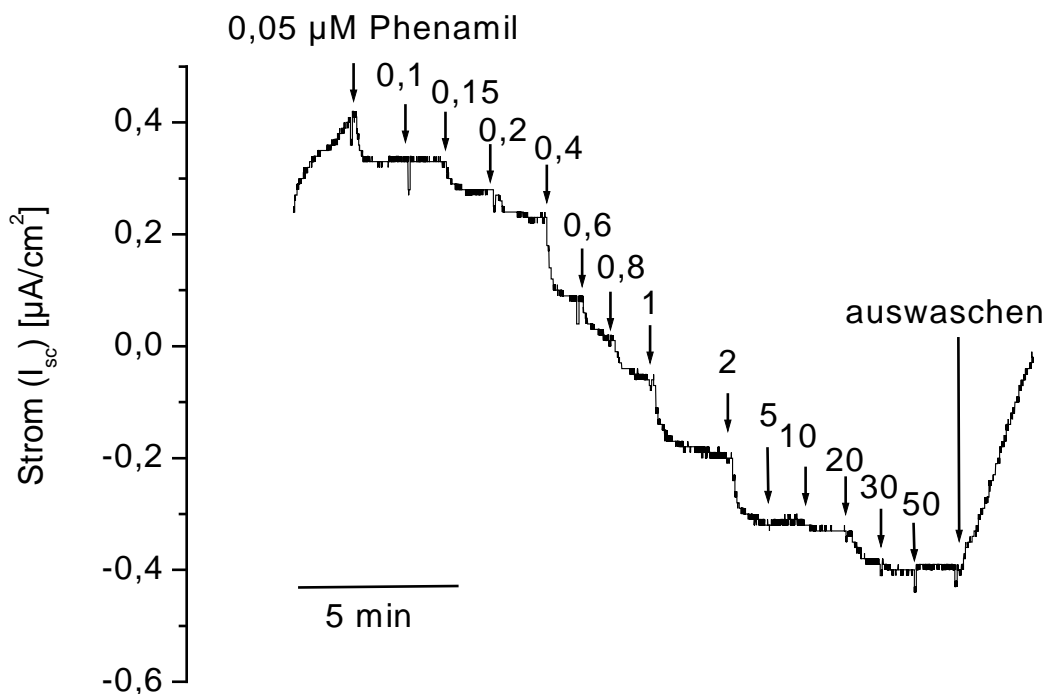
#### 4.2.2.4 Phenamil-Sensitivität

Die Abkürzung Phenamil steht für 3,5-Diamino-6-Chloro-N-[Imino(Phenyl-amino)Methyl]-Pyrazin-Carboxamid.



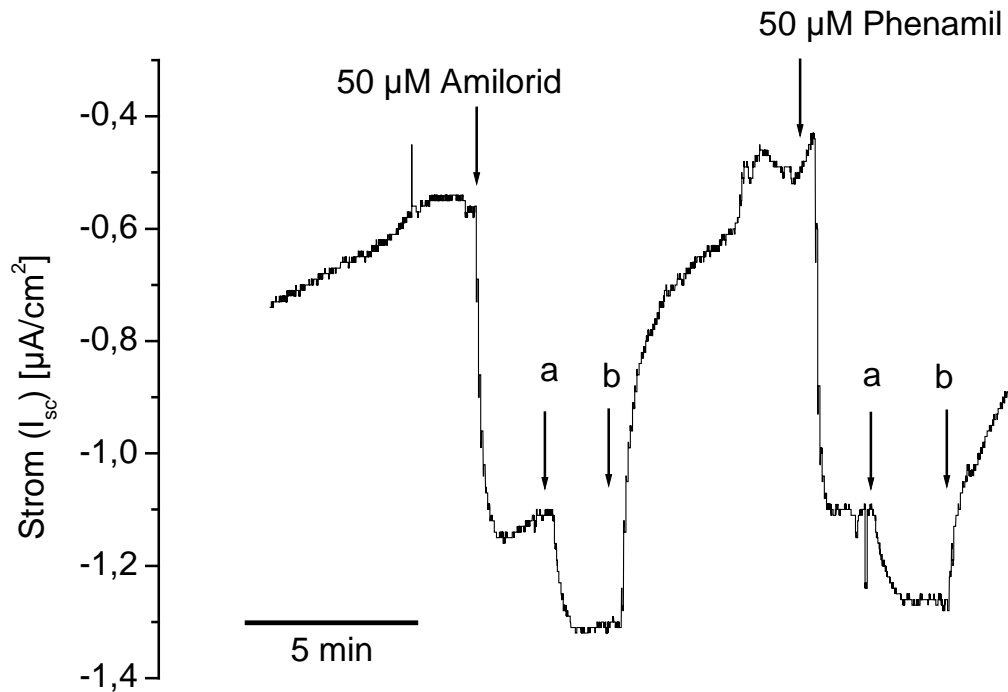
**Formel 3:** Strukturformel des Phenamils, einem Amiloridanalogs mit einem Phenylrest an der Guanidingruppe.

Die Zugabe steigender Phenamilkonzentrationen zur apikalen Lösung wirkte sich ebenfalls hemmend auf den  $I_{sc}$  aus. Die Kurve nahm einen ähnlichen Verlauf wie bei Amilorid. Auch bei Phenamil wurde eine maximale Stromhemmung bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  erreicht. Im Gegensatz zu anderen Geweben, wo Phenamil als irreversibler Blocker des Epithelialen Natriumkanals beschrieben wurde (Garvin 1985), ließen sich die Effekte auf die Regenwurmhaut durch Auswaschen mit PW rückgängig machen.



**Abbildung 16:** Der Stromverlauf bei apikaler Gabe von Phenamil auf Regenwurmhaut wies große Parallelen zur der bei Amiloridapplikation auf.

Die Kinetikkurve des Phenamils unterschied sich weniger stark von der des Amilorids, als dies bei Benzamil der Fall war. Eine halbmaximale Hemmung wurde bei  $0,51 \pm 0,05 \mu\text{M}$  erreicht ( $n = 13$ ). Im Gegensatz zur Situation bei Benzamil, hemmte Phenamil ebenso wie Amilorid nur einen Teil des vom Natrium getragenen  $I_{\text{sc}}$ .

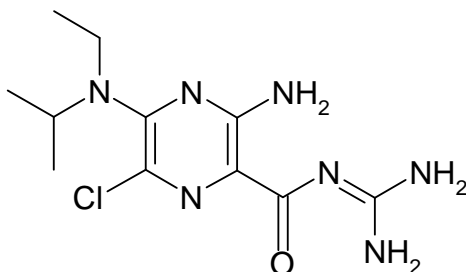


**Abbildung 17:** Phenamil hemmte etwa denselben Anteil am Gesamtnatriumstrom wie Amilorid. a: Natrium-freies PW apikal, b: apikales Auswaschen mit PW



#### 4.2.2.5 EIPA-Sensitivität

Als ein weiteres Amiloridanalog wurde letztlich auch die Wirkung von EIPA auf den  $I_{sc}$  untersucht.



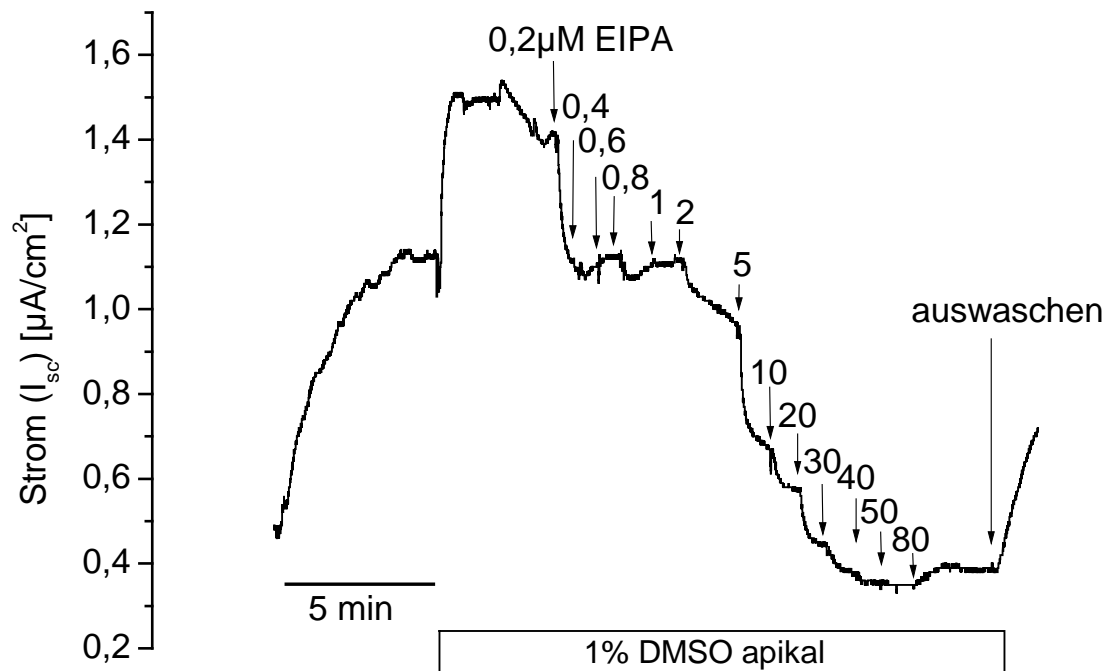
**Formel 4:** Bei EIPA liegt die Veränderung gegenüber Amilorid in einer Substitution der 5-Aminogruppe des Pyrazinrings.

5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)Amilorid (EIPA) ist nicht wasserlöslich. Daher musste auf einen Lösungsvermittler zurückgegriffen werden. In Frage kommen hierfür z.B. Alkohole (Methanol) oder das organische Lösungsmittel Dimethyl-Sulfoxid (DMSO).

DMSO ist in der Lage, die Membranen von tierischen und pflanzlichen Zellen zu überwinden, ohne dabei Schäden zu hinterlassen, weshalb es für die Versuche an dem empfindlichen einschichtigen Epithel des Regenwurms geeigneter erschien als z.B. Methanol, welches Protein-denaturierende Eigenschaften hat.

Verwendet wurde eine 10 mM Stammlösung von EIPA in DMSO. Für die Versuchsreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen von EIPA in Lösung eingesetzt, was zu Endkonzentrationen zwischen 0,002 % und 1 % DMSO im Ansatz führte. Vorversuche hatten aber gezeigt, dass DMSO alleine auch Wirkungen auf die elektrophysiologischen Parameter hatte ( $n = 7$ ). Und zwar führte eine apikale Gabe der Substanz zu einer Senkung des Gewebswiderstandes, während der  $I_{sc}$  durch steigende DMSO-Konzentrationen zunächst sukzessiv stieg. Bei 5 % DMSO fiel der  $I_{sc}$  dann rapide ab. Dieser Vorgang war allerdings reversibel. Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu verhindern, wurde bei der folgenden Versuchsreihe in allen Konzentrationsschritten einen DMSO-Level von 1 % hergestellt und dem Integument auch vor Versuchsbeginn eine Anpassungsphase an 1 % DMSO in PW gelassen.

Im Vergleich zu den anderen getesteten Amiloridanalogen verlief die Kurve der EIPA-Kinetik flacher (vgl. Abb. 19 A). Für die halbmaximale Hemmung des  $I_{sc}$  ergab sich hier  $K_{1/2} = 3,09 \pm 0,59 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ).



**Abbildung 18:** Verlauf des Stroms bei zunehmenden EIPA-Konzentrationen auf der apikalen Seite der Regenwurmhaut nach Anpassung an 1 % DMSO in der Lösung.

#### 4.2.2.6 Zusammenfassung

Amilorid und seine Analoga Benzamil, Phenamil und EIPA bewirkten alle eine dosisabhängige Hemmung des  $I_{sc}$  am Integument von *Lumbricus terrestris*. Die an den hyperbolen Dosis-Wirkungs-Kurven mit Hilfe der Gleichung Michaelis-Menten-Kinetik ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen unterschieden sich jedoch. Am sensitivsten reagierte der Strom auf die apikale Gabe von Benzamil.  $K_{1/2}$  lag hier bei  $0,06 \pm 0,006 \mu\text{M}$ . An zweiter Stelle stand Phenamil, dessen halbmaximale Hemmkonzentration mit  $K_{1/2} = 0,52 \pm 0,05 \mu\text{M}$  bei 40 % von der des Amilorids ( $K_{1/2} = 1,28 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ) lag. Am flachsten verlief die Kurve der EIPA-Kinetik. Der ermittelte Wert von  $K_{1/2} = 3,09 \pm 0,59 \mu\text{M}$  war mehr als fünfzigfach höher als der von Benzamil.

**Tabelle 3:** Regenwurmintegument zeigte ein Sensitivitätsprofil von Benzamil > Phenamil > Amilorid > EIPA

	Benzamil	Phenamil	Amilorid	EIPA
$K_{1/2} [\mu\text{M}]$	$0,06 \pm 0,006$	$0,53 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,08$	$3,09 \pm 0,59$
n	16	13	14	6

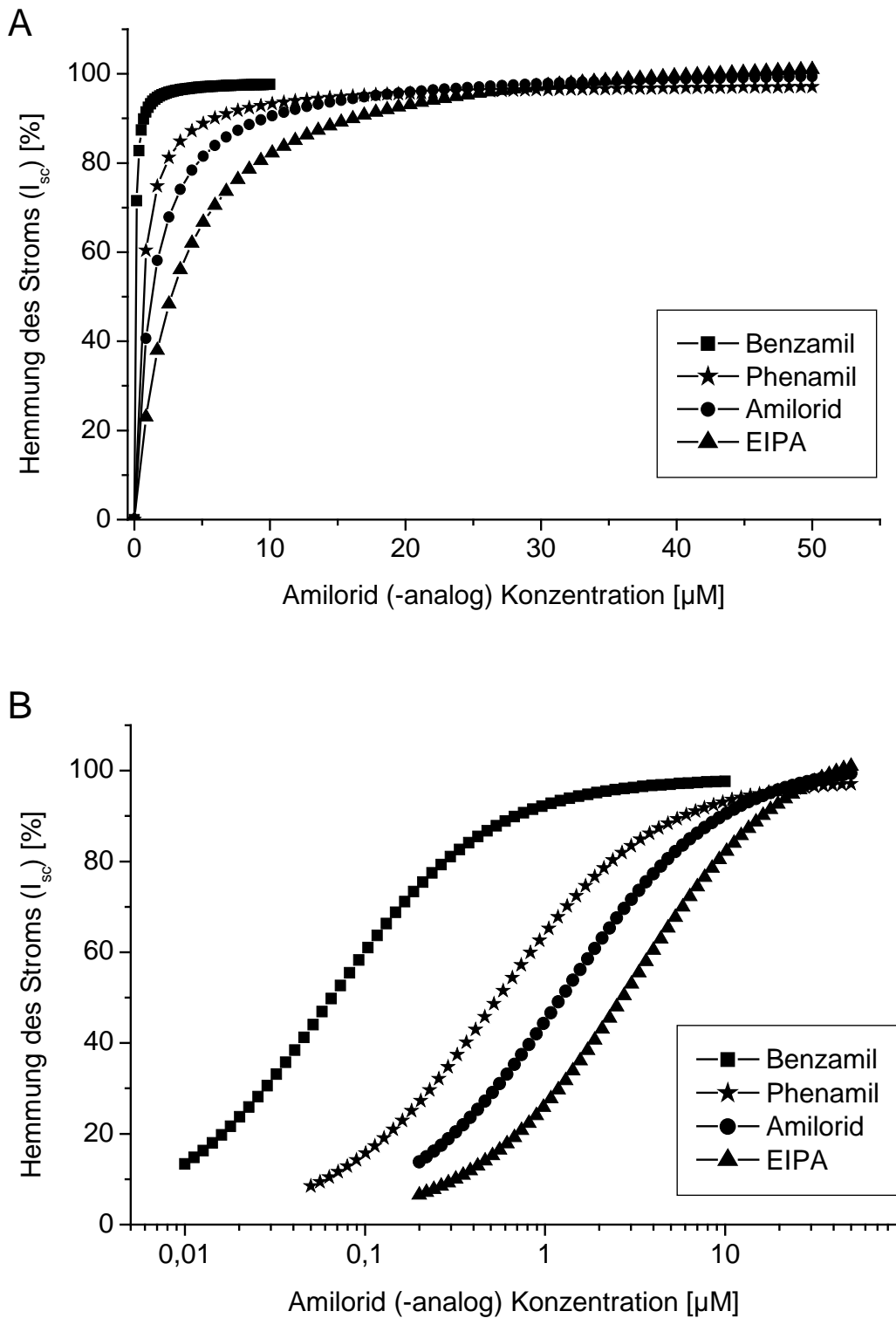
Anders ausgedrückt kann man auch die Potenz der Analoge als relative Aktivität verglichen mit der Ursprungssubstanz Amilorid angeben. Die Werte lassen sich durch Division ermitteln:

$$K_{1/2} (\text{Amilorid}) / K_{1/2} (\text{Analog})$$

So ergibt sich für Amilorid der Wert 1. Für die Analoge gilt, je höher der Wert, desto höher die Wirksamkeit.

**Tabelle 4:** Die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen wird relativ zu der von Amilorid angegeben.

Amilorid (-analog)	Relative Potenz
EIPA	0,4
Amilorid	1
Phenamil	2,4
Benzamil	21,3



**Abbildung 19:** Die einzelnen Amiloridanaloga hatten unterschiedlich starke dosisabhängige Wirkungen auf den  $I_{sc}$ . A: Die mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik berechneten hyperbolen Kurven (vgl. Kap. 3.2.5) nehmen einen unterschiedlich steilen Verlauf, bedingt durch die verschiedenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen der getesteten Substanzen. B: In der halblogarithmischen Darstellung spiegelt die Lage der einzelnen Kurven die Affinität der Substanzen zum Ionenkanal wieder.

## 4.2.3 Selektivität des Gewebes für Alkalimetalle

### 4.2.3.1 Versuchsziel

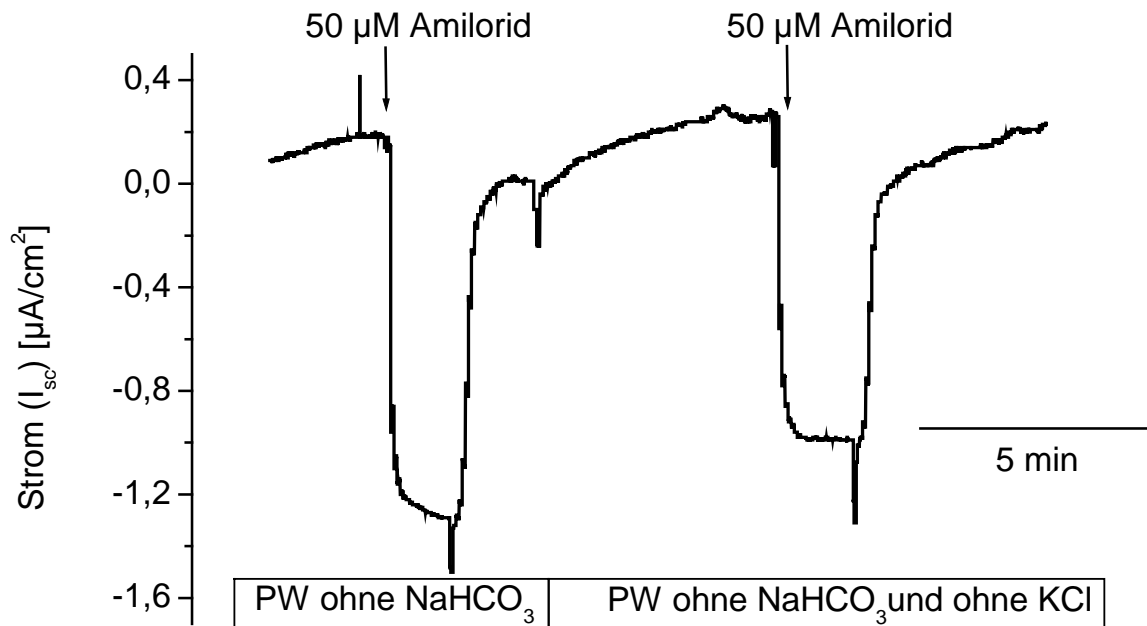
Die Selektivität für bestimmte geladene Teilchen ist ein wesentliches charakteristisches Merkmal eines Ionenkanals. Ziel dieser Versuchsreihe war es zu untersuchen, ob Natrium in der apikalen Lösung unter Beibehaltung der sonstigen Parameter durch andere einwertige Kationen aus der ersten Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente ersetzt werden kann. Es stellte sich die Frage, ob andere Alkalimetalle das Gewebe passieren und den Strom aufrechterhalten können, und ob weiterhin eine Reaktion auf Amilorid sichtbar ist.

### 4.2.3.2 Vorversuche

Für diese Untersuchungen war es nötig, das Natrium in der apikalen Lösung komplett zu ersetzen. Dabei wurde NaCl jeweils durch das Chloridsalz der zu testenden Alkalimetalle ersetzt. Das PW enthielt in dieser Versuchsreihe kein  $\text{NaHCO}_3$ . Es wurde nicht ersetzt, da von einigen Alkalimetallen keine Hydrogencarbonate herstellbar waren. Es ist daher zu beachten, dass sich die Osmolarität der Lösung auf diese Art und Weise leicht veränderte (2,3 mosmol/l im Gegensatz zu 2,7 mosmol/l), und dass dem Gewebe überhaupt kein Bicarbonat zu Verfügung stand.

Die Anfangsbedingungen bei Versuchsstart entsprachen denen bei allen anderen Versuchen, also Perfusion mit PW apikal und ERS basolateral. Dann wurde das PW durch PW ohne  $\text{NaHCO}_3$  ersetzt. In einigen Fällen stieg der  $I_{sc}$  dadurch leicht an, in anderen Fällen sank er ab, wodurch sich insgesamt kein signifikanter, einheitlicher Effekt auf den Strom ergab. Unabhängig von den Ausgangsbedingungen (PW mit oder ohne  $\text{NaHCO}_3$ ), bewirkte aber die Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Amilorid ein vergleichbares Absinken des Stroms.

Da das üblicherweise verwendete PW zusätzlich noch geringe Mengen KCl enthält, und die Selektivität des Gewebes auch gegen  $\text{K}^+$  getestet werden sollte, musste auch dieses Alkalikation eliminiert werden. Es wurde nicht ersetzt, und es stellte sich heraus, dass der Entzug von  $\text{K}^+$  aus der apikalen Lösung eine Stromsteigerung bewirkte (vgl. hierzu Kap. 4.3.5.3). Der  $I_{sc}$  stabilisierte sich auf einem höheren Niveau. Das Gewebe reagierte aber auch unter diesen Bedingungen typisch auf Amilorid (Abb. 20)



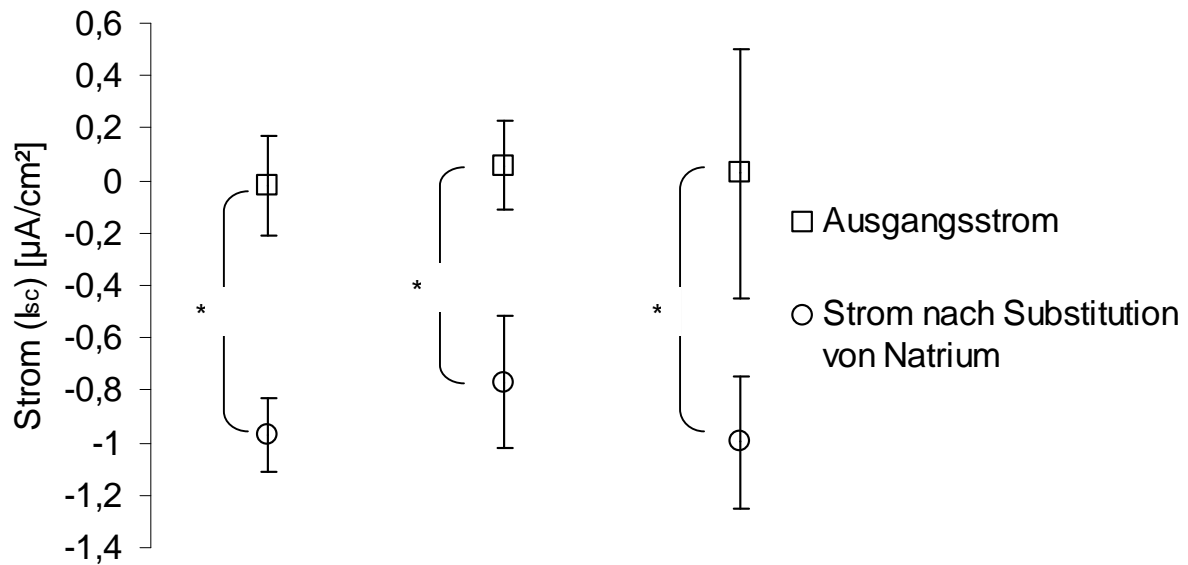
**Abbildung 20:** Auch in Abwesenheit von  $NaHCO_3$  und KCl im PW reagierte das Gewebe auf die apikale Gabe von Amilorid mit einer vergleichbaren Absenkung des Stroms.

#### 4.2.3.3 Selektivitätsversuche

In den folgenden Versuchen erhielt das Gewebe zunächst die Gelegenheit, sich an die üblichen Ausgangsbedingungen anzupassen (also ERS basolateral und PW apikal). Die Reaktion auf die apikale Gabe von 50  $\mu M$  Amilorid wurde untersucht und die Substanz dann wieder mit PW ausgewaschen.

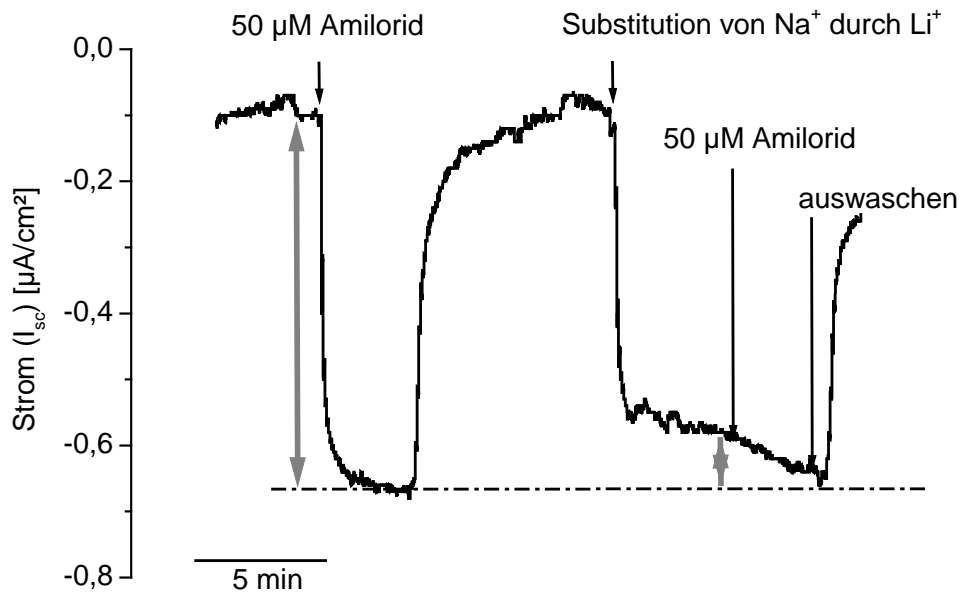
Dann wurde apikal auf PW umgestellt, welches an Stelle von Natriumchlorid ein anderes Alkalimetallchlorid enthielt. Dabei zeigte sich, dass kein anderes getestetes Alkalimetall in der Lage war, einen mit Natrium vergleichbaren Strom aufrecht zu erhalten. Verglichen mit dem Ausgangswert des Stroms unter Natriumbedingungen sank der Strom bei Substitution von Natrium durch Kalium um durchschnittlich  $0,95 \pm 0,16 \mu A/cm^2$  ( $n = 12$ ) (Abb. 21), bei Rubidium um  $0,53 \pm 0,12 \mu A/cm^2$  ( $n = 12$ ), bei Cäsium um  $0,82 \pm 0,11 \mu A/cm^2$  ( $n = 12$ ) und bei Lithium um  $1,03 \pm 0,40 \mu A/cm^2$  ( $n = 12$ ).

Nach einer Stabilisierung des Stroms wurde in der Folge die Reaktion auf die apikale Gabe von 50  $\mu M$  Amilorid unter diesen Bedingungen untersucht. Die Depression des  $I_{sc}$  nach Amiloridgabe in Anwesenheit der verschiedenen Alkalikationen wurde jeweils direkt mit der Reaktion auf Amilorid unter Natrium-Bedingungen verglichen (100 %-Wert). Innerhalb eines Versuches wurde die Reaktion des Gewebes auf Amilorid immer abwechselnd unter Natrium-Bedingungen und denen eines anderen Alkalikations untersucht und paarweise verglichen.

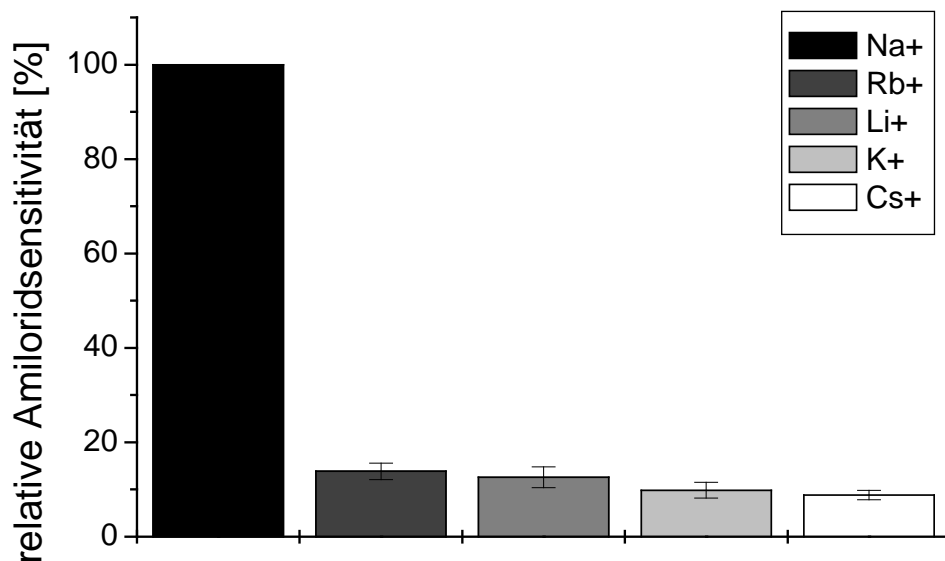


**Abbildung 21:** Die Plateauwerte im Strom unter Natriumbedingungen zu Beginn der Experimente (Quadrate) und nach Substitution des Natriums durch andere Alkalimetalle (Kreise). Von links nach rechts: Kalium, Cäsium, Lithium. Ein Stern (\*) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte.

Wurde die apikale Perfusion des Gewebes von PW mit NaCl (ohne NaHCO<sub>3</sub> und ohne KCl, vgl. oben) auf PW, in dem Natriumchlorid durch Lithiumchlorid ersetzt wurde umgestellt, so sank der Strom und stabilisierte sich auf einem niedrigeren Niveau (Abb. 22). Regenwurmhaut zeigte nach dieser Anpassungsphase dann auch eine Reaktion auf Amilorid in LiCl-haltigem pond-water, aber der Effekt war sehr viel geringer als unter Na<sup>+</sup>-Bedingungen. D.h. die relative Amiloridsensitivität unter Lithium-Bedingungen war geringer als unter Natrium-Bedingungen, und zwar im Durchschnitt  $12,6 \pm 2,2$  % verglichen mit Na<sup>+</sup> (n = 20; N = 6). Weiterhin ergab sich eine relative Amiloridsensitivität unter Rubidiumbedingungen von  $13,8 \pm 1,8$  % verglichen mit Natrium (n = 12; N = 5). Versuche mit Cäsium ergaben, dass unter diesen Bedingungen nur  $8,8 \pm 1$  % der Amiloridvergleichsantwort unter Natriumbedingungen zu erreichen war (n = 20; N = 8). Bei Kalium lag der ermittelte Wert bei  $9,8 \pm 1,7$  % (n = 19; N = 8). Auch wenn optisch der Eindruck eines Selektivitätsprofils von Na<sup>+</sup> >> Rb<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> entstand (Abb. 23), so ergab die Varianzanalyse, dass sich die Mittelwerte der I<sub>sc</sub>-Depression nach Amiloridgabe unter Rb-, Cs, K- und Li-Bedingungen untereinander nicht signifikant voneinander unterschieden.



**Abbildung 22:** Nach einer Substitution von NaCl durch LiCl in der apikalen Lösung reagierte das Gewebe sehr viel schwächer auf die Gabe von Amilorid (Doppelpfeile) als vorher.



**Abbildung 23:** Regenwurmhaut zeigte bei einem Vergleich des amiloridsensitiven Stroms ein Selektivitätsprofil von  $Na^+ \gg Rb^+ \geq Li^+ \geq K^+ \geq Cs^+$ .

#### 4.2.3.4 Zusammenfassung:

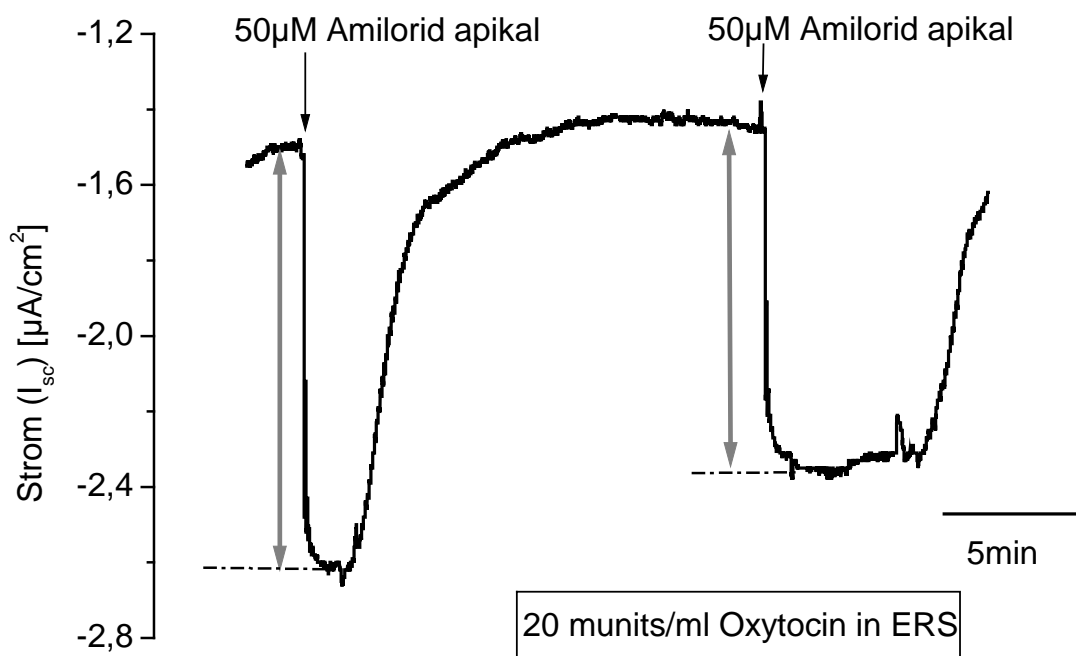
Die Substitution von Natrium durch andere Alkalimetallkationen ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ ) im apikalen PW hatte in allen Fällen eine signifikante Senkung des Stroms mit anschließender Stabilisierung auf ein niedrigeres Niveau zur Folge ( $p \leq 0,001$ ). Die Amiloridantworten im  $I_{sc}$  bei Substitution von  $Na^+$  durch andere Alkalimetalle unterschieden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ) von der Amiloridantwort des Gewebes unter  $Na^+$ -Bedingungen. Dabei spielte es keine Rolle, durch welches andere Alkalimetall das Natrium ersetzt wurde (Abb. 23).



#### 4.2.4 Hormonelle Regulation des ENaC

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung unterschiedlicher Peptidhormone auf den Strom untersucht (vgl. Tab. 5). Die meisten der untersuchten Hormone stellten Peptide der Oxytocin/Vasopressin-Familie der Vertebraten dar, aber es wurde auch die Wirkung von Invertebratenpeptiden wie 8-lys-Conopressin (aus der Spritzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis*) und Annetocin (aus dem Regenwurm *Eisenia foetida*) untersucht.

In den Versuchen wurden nach Equilibrierung des Gewebes apikal 50  $\mu\text{M}$  Amilorid appliziert. Diese erste Amiloridantwort unter den gewöhnlichen Bedingungen mit PW apikal und ERS basolateral diente im Weiteren als Referenzwert. Nach apikalem Auswaschen und erneuter Stabilisierung des Stroms wurde basolateral auf ERS umgestellt, die das zu testende Hormon in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  enthielt. Für die Versuchsreihe mit Oxytocin wurden zunächst 20 munits/ml eingesetzt, was in etwa der Konzentration der anderen Hormone entsprach. Nachdem das Hormon ca. 10 min Zeit hatte einzuwirken, wurden apikal erneut 50  $\mu\text{M}$  Amilorid gegeben. Im Folgenden wurde diese zweite Amiloridantwort des Gewebes (unter Hormoneinfluss) jeweils mit der ersten Amiloridantwort (unter Normalbedingungen) verglichen. Zwischen den beiden Amiloridreaktionen lag im Durchschnitt eine Zeitspanne von 15 min bei einer Einwirkdauer des Hormons von etwa 10 min auf das Gewebe vor der zweiten Amiloridgabe.



**Abbildung 24:** Verlauf des  $I_{sc}$  in einem typischen Experiment zur Untersuchung der Wirkung von Peptidhormonen auf  $I_{amilo}$  (Doppelpfeile).

Gegenüber der Amiloridantwort unter Normalbedingungen wurde der amiloridsensitive Strom ( $I_{\text{amilo}}$ ) bei basolateraler Gabe von jeweils 5  $\mu\text{M}$  des entsprechenden Peptids, je nach eingesetztem Peptid, entweder größer oder kleiner.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt allein aufgrund der zeitlichen Verzögerung aufgetreten war, wurden Kontrollversuche gemacht, in denen basolateral kein Hormon appliziert wurde, aber trotzdem die gleiche Zeit (rund 15 min) bis zur zweiten Amiloridgabe eingehalten wurde (Kontrollgruppe). Wie sich dabei herausstellte, war die Zeit alleine nicht für die Veränderung des Amilorideffekts verantwortlich. Die zweite Amiloridantwort lag bei durchschnittlich  $97,5 \pm 4,5 \%$  ( $n = 7$ ) der ersten und unterschied sich statistisch nicht signifikant von dieser.

**Tabelle 5:** Primärstrukturen der in den Versuchen eingesetzten Peptide. Die Leserichtung ist N-Terminus links und C-Terminus rechts. Die Peptide sind alle am C-Terminus amidiert. Die ersten sechs Aminosäuren im Molekül bilden eine Ringstruktur.

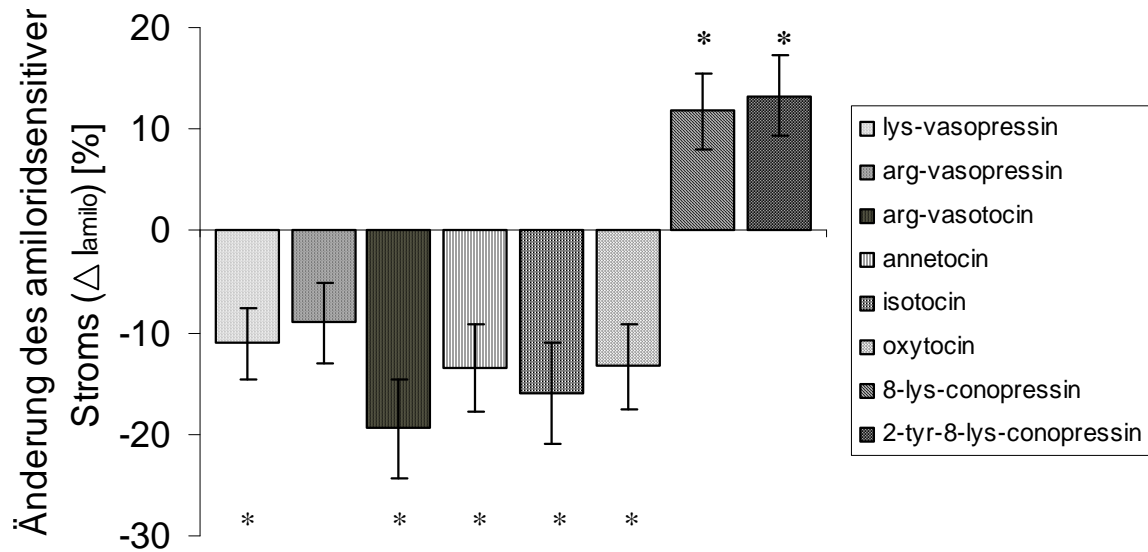
Name	Primärstruktur (Aminosäuresequenz) des Peptidhormons									
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Vertebratenpeptide:										
Oxytocin (Säugetiere)	cys	tyr	ile	gln	asn	cys	pro	leu	gly	NH <sub>2</sub>
8-arg-Vasotocin (Vögel, Amphibien, Fische)	cys	tyr	ile	gln	asn	cys	pro	arg	gly	NH <sub>2</sub>
Isotocin (Fische)	cys	tyr	ile	ser	asn	cys	pro	ile	gly	NH <sub>2</sub>
8-lys-Vasopressin (Schwein, Nilpferd)	cys	tyr	phe	gln	asn	cys	pro	lys	gly	NH <sub>2</sub>
8arg-Vasopressin (sonstige Säugetiere)	cys	tyr	phe	gln	asn	cys	pro	arg	gly	NH <sub>2</sub>
Invertebratenpeptide:										
Annetocin (aus <i>Eisenia</i> , Lumbricidae)	cys	phe	val	arg	asn	cys	pro	thr	gly	NH <sub>2</sub>
8-lys-Conopressin (aus <i>Lymnea</i> , Mollusca)	cys	ile	ile	arg	asn	cys	pro	lys	gly	NH <sub>2</sub>
neu synthetisiertes Peptid:										
2-tyr-8-lys-Conopressin	cys	tyr	ile	arg	asn	cys	pro	lys	gly	NH <sub>2</sub>

Bei Applikation von Isotocin sank der  $I_{\text{amilo}}$  um durchschnittlich  $16 \pm 5 \%$  ( $n = 8$ ) gegenüber der Kontrollgruppe, bei Annetocin um  $13,4 \pm 4,3 \%$  ( $n = 11$ ), bei Lys-Vasopressin um  $11,1 \pm 3,5 \%$  ( $n = 7$ ), bei Arg-Vasopressin um  $9,1 \pm 3,9 \%$  ( $n = 6$ ) und bei Arg-Vasotocin um  $19,4 \pm 4,8 \%$  ( $n = 7$ ). 20 munits/ml Oxytocin bewirkten eine Verminderung des amiloridsensitiven Stroms um  $13,4 \pm 4,2 \%$  ( $n = 6$ ). Im Gegensatz dazu bewirkte das Invertebraten-Peptid 8-lys-Conopressin eine signifikante Steigerung des  $I_{\text{amilo}}$  um  $11,8 \pm 3,8 \%$  ( $n = 8$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 25). Bei der Berechnung und graphischen Darstellung der hier aufgeführten Differenzen zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Testgruppen und der Kontrollgruppe wurde das Prinzip der summativen Fehlerfortpflanzung beachtet.

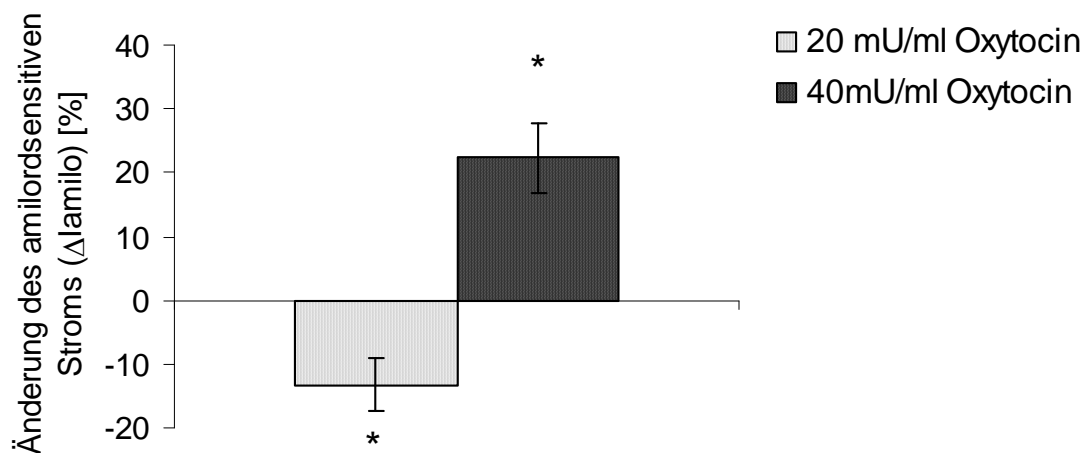
Aufgrund eines Vergleichs der Primärstrukturen der einzelnen Peptide (vgl. Tab. 5) ergab sich der Ansatz, dass die unterschiedliche Wirkung der Hormone auf  $I_{\text{amilo}}$  auf die Aminosäure an Position 2 im Peptid zurückzuführen sein könnte. Die Hormone, die eine Depression des  $I_{\text{amilo}}$  hervorgerufen haben, hatten alle eine aromatische Aminosäure an Position 2 (Tyrosin bzw. Phenylalanin). Lys-Conopressin hingegen hat hier eine aliphatische Aminosäure (Isoleucin) im Molekül. Deshalb wurde ein neues Peptid synthetisiert (durch die Firma Advanced ChemTech, Giessen), welches dem Lys-Conopressin entsprach, jedoch mit einem Tyrosin statt des Isoleucins an Position 2 (2-tyr-8-lys-conopressin). Die Applikation dieses neuen Peptids in derselben Konzentration ( $5 \mu\text{M}$ ) führte jedoch ebenso wie Lys-Conopressin zu einem Anstieg des  $I_{\text{amilo}}$ , und zwar im Mittel um  $13,3 \pm 4 \%$  ( $n = 8$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 25).

Versuche mit einer Dosierung von 40 munits/ml Oxytocin führten jedoch zu einem interessanten Ergebnis. Es wurde eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung auf  $I_{\text{amilo}}$  deutlich. Während 20 munits/ml Oxytocin eine Hemmung des  $I_{\text{amilo}}$  bewirkt hatten (s.o.), war durch eine Verdopplung der Oxytocinkonzentration auf 40 munits/ml ein Anstieg des  $I_{\text{amilo}}$  um  $22,34 \pm 5,5 \%$  ( $n = 12$ ) gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 26).

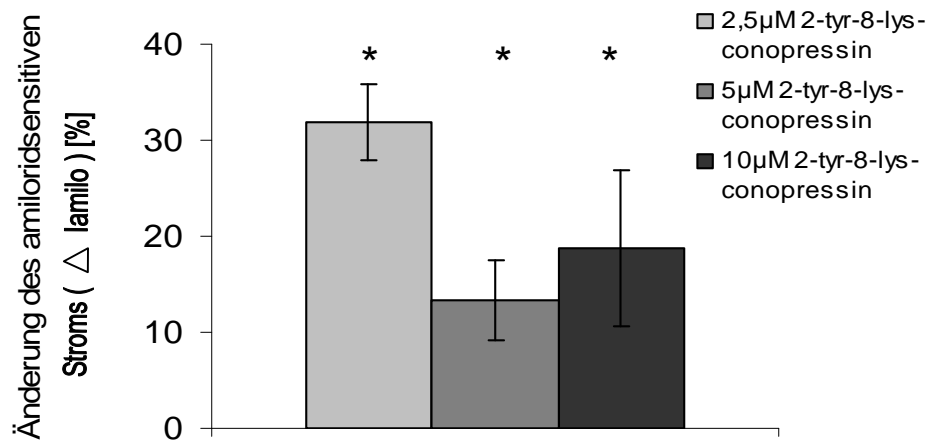
Eine Variation der Konzentration des 2-tyr-8-lys-Conopressins, welches den  $I_{\text{amilo}}$  in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  stimuliert hatte (s.o.), führte hingegen weder bei einer Halbierung noch bei einer Verdopplung der Konzentration zu einem qualitativen Unterschied im Ergebnis. Auch in einer Konzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  stimulierte das Peptid den  $I_{\text{amilo}}$ , und zwar um  $31,9 \pm 4,2 \%$  ( $n = 4$ ), und in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  stimulierte es den  $I_{\text{amilo}}$  um  $18,7 \pm 8,1 \%$  ( $n = 4$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 27).



**Abbildung 25:** Die durch die Applikation unterschiedlicher Peptidhormone hervorgerufene Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ ). Als Bezug (x-Achse) dient der Mittelwert der Kontrollgruppe (ohne Hormoneinfluss). Signifikante Änderungen des  $I_{\text{amilo}}$  von der Kontrollgruppe sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Die Reihenfolge der Balken im Diagramm von links nach rechts entspricht der Reihenfolge der Legende von oben nach unten.

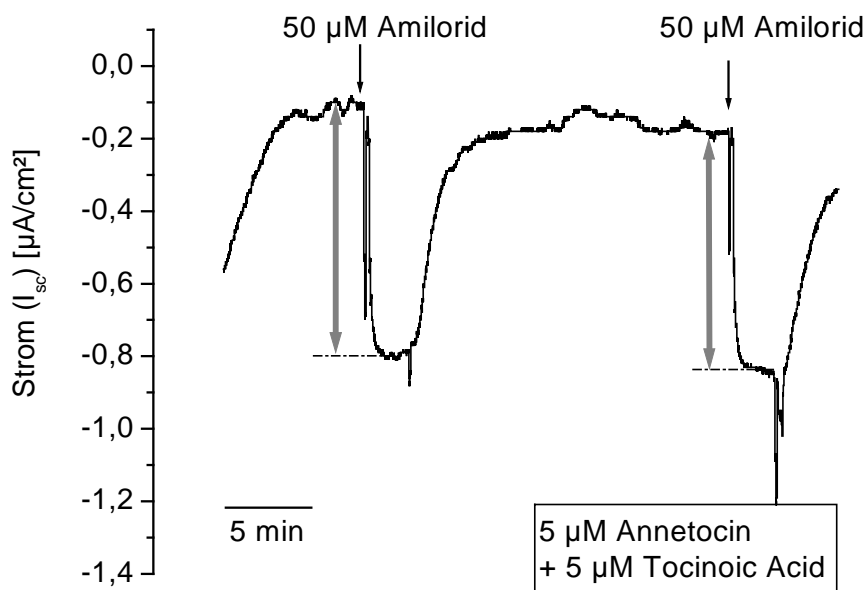


**Abbildung 26:** Vergleich der Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ ) bei Gabe von 20 munits/ml ( $n = 6$ ) bzw. 40 munits/ml Oxytocin ( $n = 12$ ) für 10 min auf der basolateralen Seite. Als Bezug (x-Achse) dient der Mittelwert der Kontrollgruppe (ohne Hormoneinfluss). Ein Stern (\*) deutet eine signifikante Änderung des  $I_{\text{amilo}}$  gegenüber der Kontrollgruppe an.



**Abbildung 27:** Vergleich der Änderung des amiloridsensitiven Stroms ( $\Delta I_{\text{amilo}}$ ) bei Gabe von 2,5  $\mu\text{M}$  2-tyr-8-lys-conopressin ( $n = 4$ ) bzw. 5  $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ) bzw. 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) für 10 min auf der basolateralen Seite. Als Bezug (x-Achse) dient der Mittelwert der Kontrollgruppe (ohne Hormoneinfluss). Ein Stern (\*) deutet eine signifikante Änderung des  $I_{\text{amilo}}$  an.

In der Folge wurde der Effekt des Regenwurmpeptids Annetocin bei gleichzeitiger equimolarer (jeweils 5  $\mu\text{M}$ ) Applikation von tocinoic acid (=  $[\text{Ile}^3]$ -pressinoic acid) untersucht. Das ist ein Peptid, welches nur die Ringstruktur des Oxytocins (ohne die Seitenkette von 3 Aminosäuren) darstellt und als Oxytocinrezeptorantagonist wirkt. Es stellte sich heraus, dass tocinoic acid in der Lage war, den Effekt von Annetocin auf den amiloridsensitiven Strom zu verhindern (Abb. 28).  $I_{\text{amilo}}$  wurde nicht kleiner. Die Ergebnisse der Versuchsgruppe, in der tocinoic acid und Annetocin gemeinsam appliziert wurden ( $n = 6$ ), unterschieden sich statistisch nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

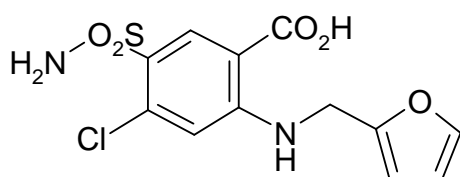


**Abbildung 28:** Vergleich der Amiloridantwort (Doppelfeile) in der Stromkurve unter Normalbedingungen und bei basolateraler gemeinsamer Applikation von Annetocin und tocinoic acid.

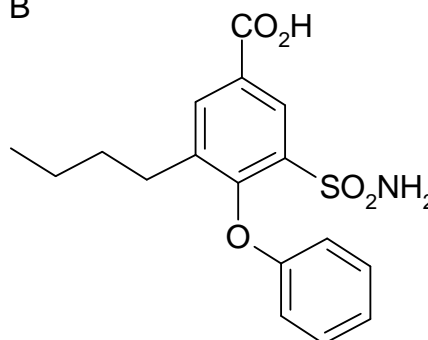
### 4.2.5 Charakterisierung des Kaliumtransportes

Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass Furosemid einen signifikanten Einfluss auf den Strom hatte, wenn es auf die apikale Seite des Gewebes gegeben wurde (Krumm 2002). Furosemid ist ein spezifischer Inhibitor des Na/K/2Cl-Cotransporters. Es sollte getestet werden, bei welcher Konzentration ein maximaler Effekt auf den Strom erreicht wird.

A



B



**Abbildung 29:** Strukturformeln von Furosemid (A) und Bumetanid (B)

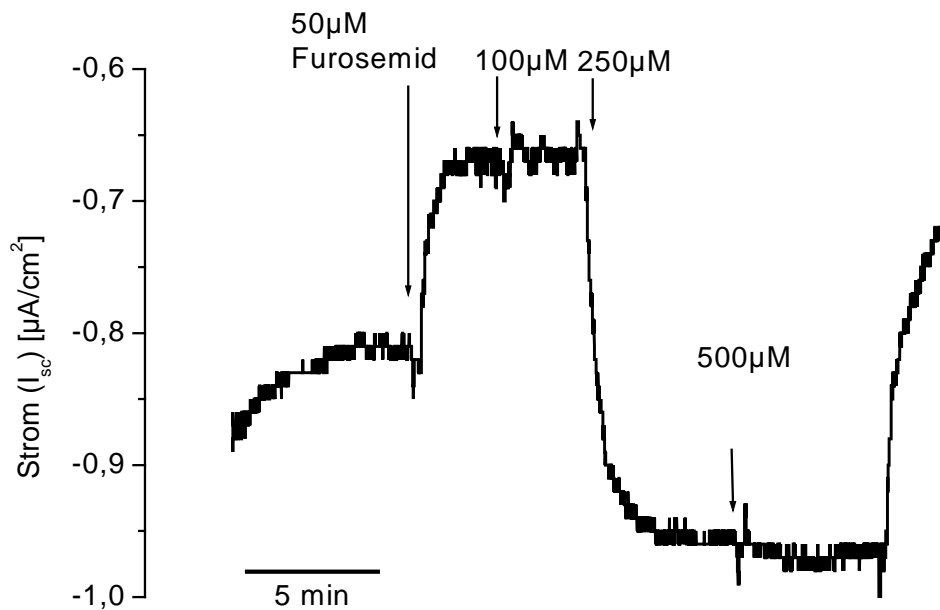
Ein weiterer Inhibitor des Cotransporters ist das Schleifendiuretikum Bumetanid (3-n-Butylamino-4-phenoxy-5-sulfamylbenzoesäure). Bumetanid ist als noch potenterer Blocker des Na/K/2Cl-Cotransporters beschrieben. Es wurde untersucht, ob hier schon bei geringeren Konzentrationen eine maximale Stromsteigerung erreicht wird und ob diese größer ist als bei Furosemid.

Außerdem sollte durch den Entzug von Kalium aus der apikalen Lösung ein zusätzlicher Anhaltspunkt für das Vorhandensein des Cotransporters überprüft werden. Der Cotransporter kann nur funktionieren, wenn alle drei Ionen zur Verfügung stehen.

#### 4.2.5.1 Verdünnungsreihe Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid wurde in Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  auf die apikale Seite des Gewebes gegeben. Hierzu wurde eine 1 M Furosemid-Stammlösung angesetzt, wobei auf DMSO als Lösungsvermittler zurückgegriffen werden musste. Die Endkonzentrationen von DMSO in der Lösung überschritten nicht 0,05 %.

Es stellte sich heraus, dass bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Furosemid in der apikalen Lösung eine maximale Stromsteigerung bereits erreicht war. Höhere Konzentrationen der Substanz führten zu einem Abfall des Stroms (Abb. 30). In weiteren Versuchen wurde also diese Konzentration verwendet, um den Na/K/2Cl-Cotransporter zu blockieren.



**Abbildung 30:** Furosemid bewirkte nur bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine Steigerung im  $I_{\text{sc}}$ .

#### 4.2.5.2 Bumetanid

Bumetanid hatte einen mit Furosemid vergleichbaren Effekt auf den  $I_{\text{sc}}$ . Bei apikaler Gabe von 100  $\mu\text{M}$  dieses Schleifendiuretikums war ebenfalls eine Stromsteigerung zu sehen.

#### 4.2.5.3 Elimination von apikalem Kalium

Das üblicherweise in den Versuchen verwendete PW enthielt Kalium nur in Form von KCl in einer Konzentration von 0,05 mM. Für diese Versuchsreihe wurde das KCl in dieser Lösung komplett weggelassen. Die hierdurch entstehende Änderung der Osmolarität ist verschwindend gering. Chlorid stand dem Gewebe weiterhin in Form von 0,5 mM NaCl und 0,4 mM  $\text{CaCl}_2$  zur Verfügung.

Es ließ sich feststellen, dass beim Entzug von Kalium aus der apikalen Lösung ebenso wie bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  zum apikalen PW eine reversible Steigerung im Strom zu verzeichnen war.

## **4.2.6 Untersuchung des Kaliumeffluxes**

Ziel der Versuchsreihe war es, Hinweise auf ein Vorhandensein von Kanälen zu erhalten, die Kalium aus der Zelle heraus lassen. In der basolateralen Membran von Epithelzellen sind im Allgemeinen nach außen gerichtete Kaliumkanäle enthalten. Solche Kanäle finden sich in manchen Epithelien aber auch in der apikalen Zellmembran, so z.B. in den Hauptzellen der Sammelrohre der Säugerniere. In diesen Zellen ist auch der ENaC der Vertebratenniere lokalisiert.

### **4.2.6.1 Flammenfotometrische Untersuchungen**

Erste Versuche hinsichtlich der Klärung der Fragestellung, ob die Epithelzellen Kaliumkanäle in der apikalen Membran enthalten, wurden gemacht, indem das Gewebe auf der apikalen Seite mit einem Kalium-freien PW (KCl wurde nicht substituiert) perfundiert wurde. In der Folge wurde die Lösung nach Gewebspassage aufgefangen und mit Hilfe eines Flammenfotometers auf das Vorhandensein von Kalium hin untersucht. Dabei ließen sich nur geringste Spuren (ca. 2  $\mu\text{M}$ ) von Kalium nach Passage des Gewebes nachweisen. Da ein Kaliumnachweis in diesem Konzentrationsbereich auch auf eine sekundäre Verunreinigung zurückzuführen sein könnte, war der Einsatz sensitiverer Messmethoden erforderlich, die in den nächsten Kapiteln beschrieben werden sollen.

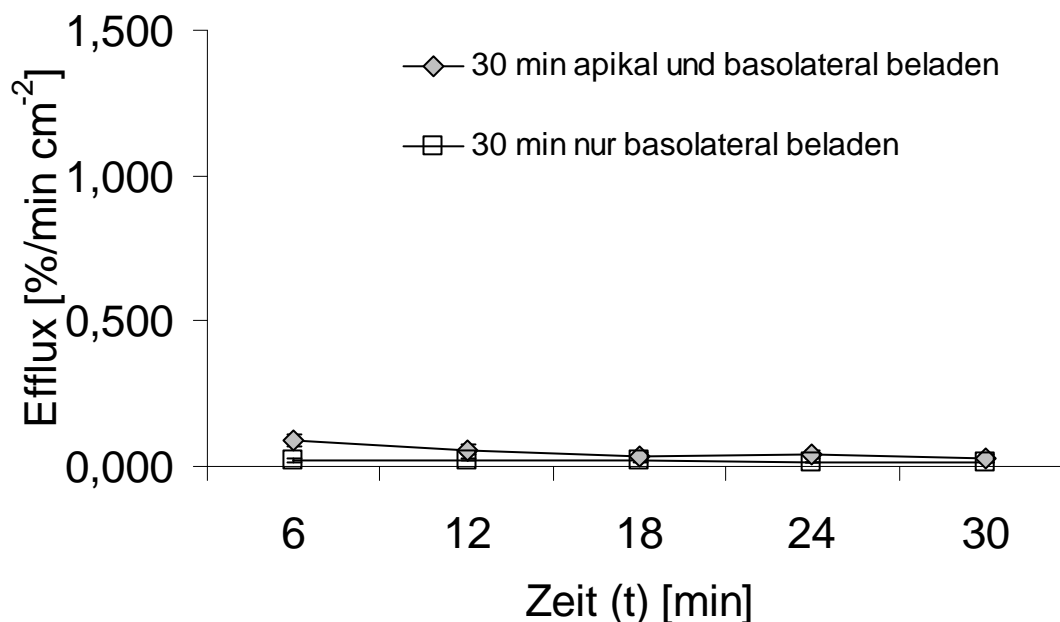


#### 4.2.6.2 Radioisotopenversuche

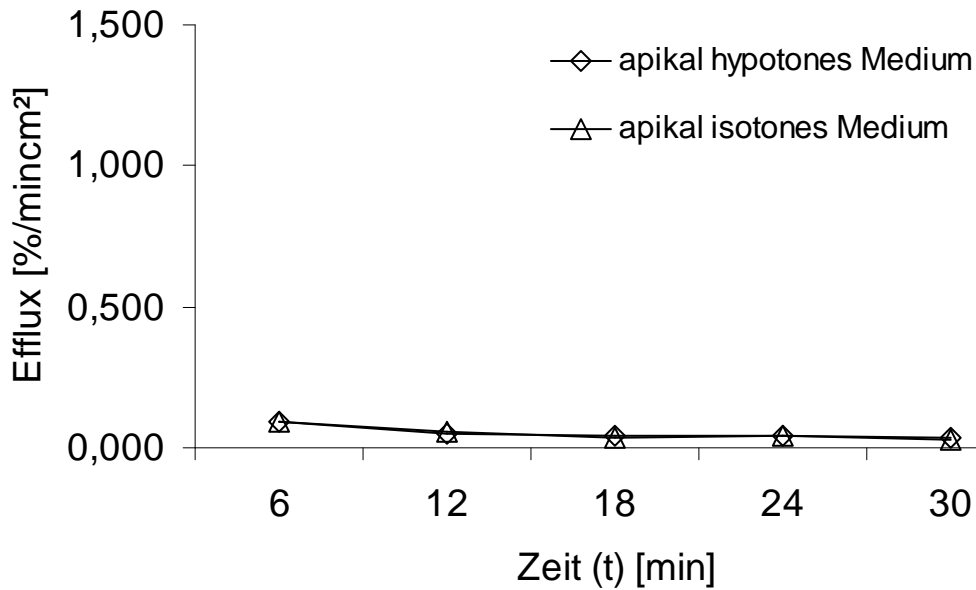
Eine solche wesentlich sensitivere Messmethode war der Einsatz von Radioisotopen. Bei dieser Versuchsreihe wurde  $^{86}\text{Rb}$  als Marker für Kalium-Transportsysteme verwendet.

Insgesamt ließ sich das Gewebe sehr gut mit  $^{86}\text{Rb}$  beladen. Es spielte dabei keine Rolle, ob die Beladungszeit 30, 60 oder 120 min betrug. Bei 30-minütiger beidseitiger Beladung erreichte das Gewebe eine Aktivität von gemessenen  $64.930 \pm 5.199$  cpm/100 mg. Das Gewebe lud wesentlich weniger stark auf, wenn nur von apikal her beladen wurde ( $8.378 \pm 1.885$  cpm/100 mg). Bei einer rein basolateralen Beladung wurden im Mittel  $110.804 \pm 15.115$  cpm/100 mg gemessen.

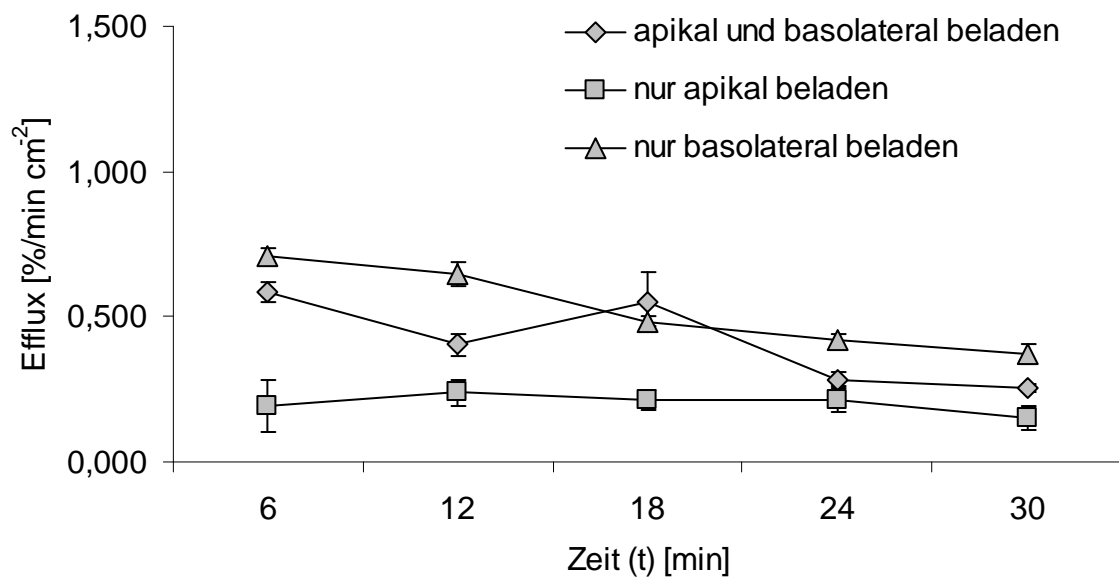
Apikal war nach beidseitiger Beladung des Gewebes mit  $^{86}\text{Rb}$  in  $_{\text{Rb}}\text{ERS}$  kaum ein Rubidiumefflux messbar ( $< 0,1 \text{ \%min}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ), und wenn nur von basolateral her beladen wurde, war der apikale Efflux praktisch Null (Abb. 31). Auch durch hypotones Medium ( $_{\text{Rb}}\text{PW}$ ) im apikalen Kammervolumen konnte kein apikaler Rubidiumefflux provoziert werden (Abb. 32). Der basolaterale Efflux war ähnlich bei beidseitiger Beladung und bei rein basolateraler Beladung. Er war etwas geringer aber noch messbar bei rein apikaler Beladung. Insgesamt waren jedoch alle gemessenen Effluxe äußerst niedrig.



**Abbildung 31:** Vergleich des apikalen Rubidiumeffluxes, nachdem 30 min lang von beiden Seiten mit  $^{86}\text{Rb}$  beladen wurde (graue Rauten,  $n = 7$ ) und bei 30-minütiger Beladung nur von der basolateralen Seite her (Quadrate,  $n = 4$ ). Apikal und basolateral wurde  $_{\text{Rb}}\text{ERS}$  verwendet.



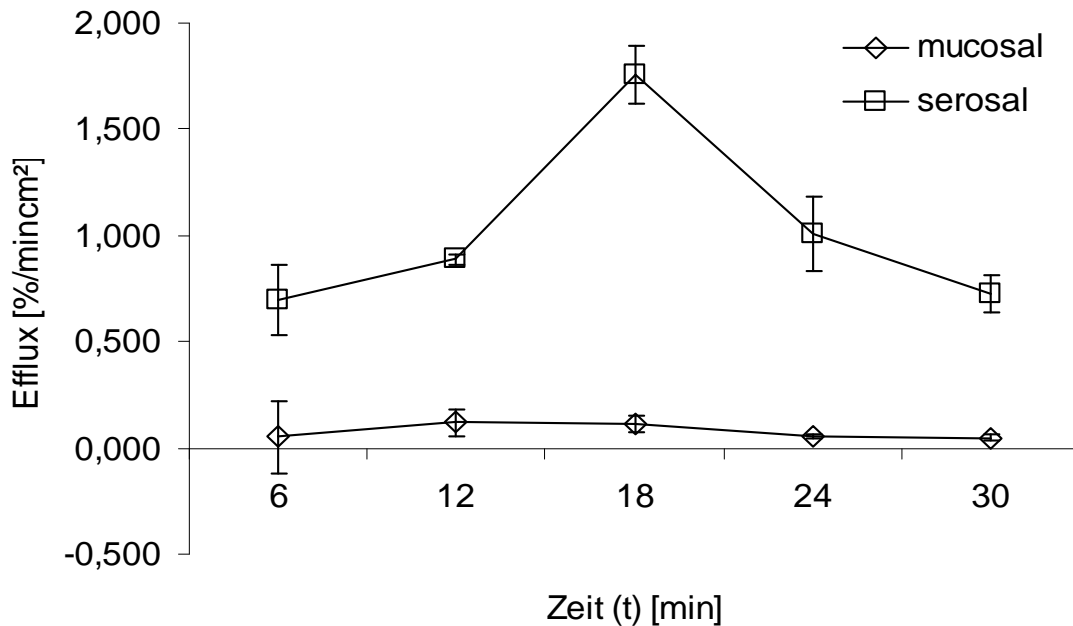
**Abbildung 32:** Vergleich des apikalen Rubidieffluxes bei Beladung in isotonem Medium (Dreiecke,  ${}_{\text{Rb}}\text{ERS}$  beidseits) sowie in hypotonem Medium (Rauten,  ${}_{\text{Rb}}\text{PW}$  außen).



**Abbildung 33:** Vergleich des basolateralen Rubidieffluxes, nachdem 30 min lang von beiden Seiten mit  ${}^{86}\text{Rb}$  beladen wurde (Rauten,  $n = 7$ ), bei 30-minütiger Beladung nur von der apikalen Seite her (Quadrat,  $n = 4$ ) sowie nur von der basolateralen Seite her (Dreiecke,  $n = 4$ ). Apikal und basolateral wurde  ${}_{\text{Rb}}\text{ERS}$  verwendet.

Im Weiteren wurden nach 18 Minuten ( $t_{18}$ ) Kaliumkanalinhibitoren wie  $\text{BaCl}_2$  (10 mM) und Chinin (1 mM) eingesetzt. Dazu wurde die Lösung in den Kammern vollständig

ersetzt. Die hierbei verlorene Radioaktivität wurde bei der Auswertung für die Proben ab  $t_{18}$  aufaddiert.



**Abbildung 34:** apikaler (Rauten) und basolateraler (Quadrate) Efflux nach 30-minütiger Beladung, RR beidseits. Nach 18 min ( $t_{18}$ ) wurden beide Lösungen ersetzt durch  ${}_{\text{RB}}\text{ERS}$  mit 1 mM Chinin.

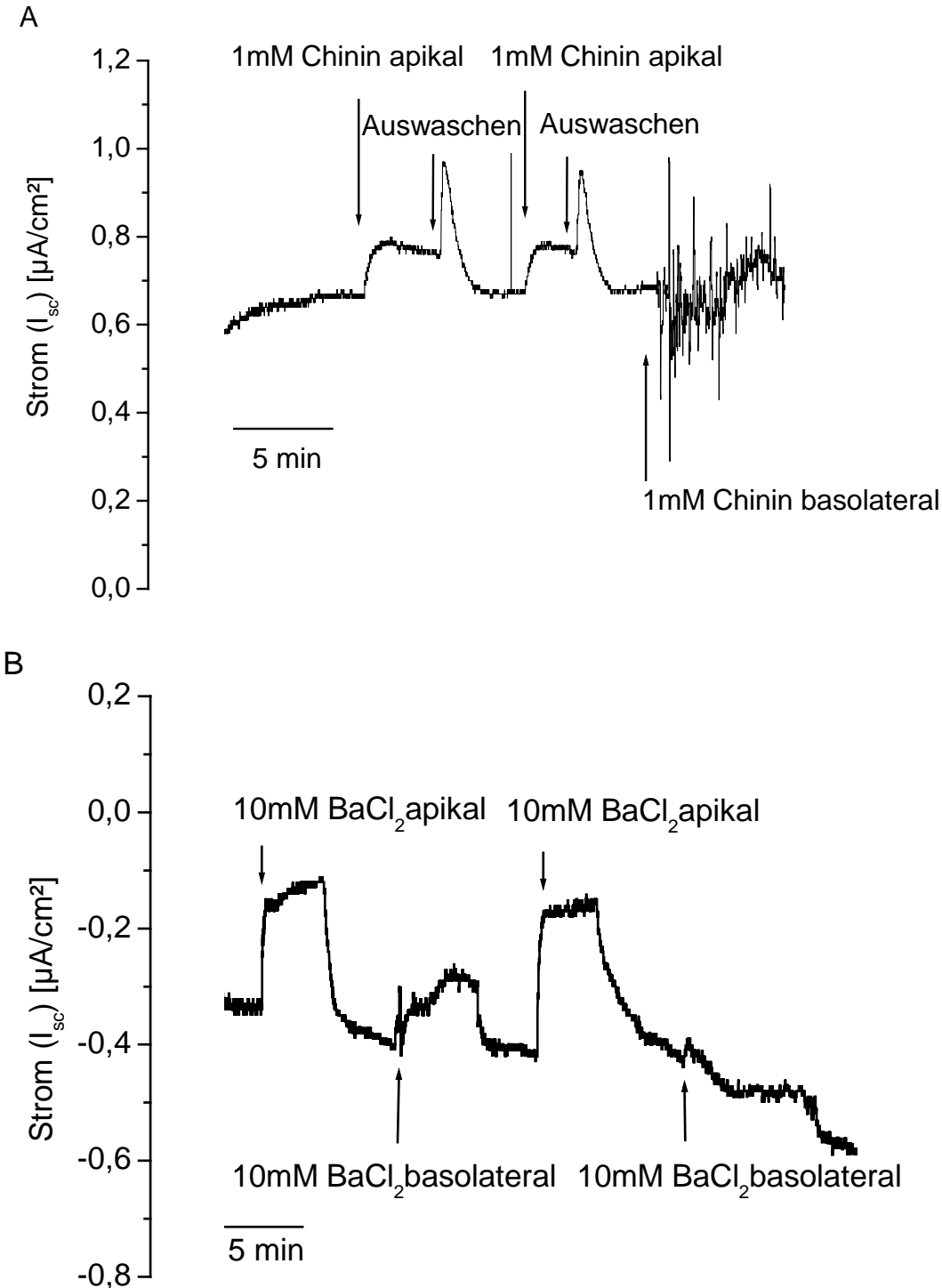
Keine der Substanzen verminderte den Efflux von  ${}^{86}\text{Rb}$ . Bei basolateraler Applikation der Substanzen fiel ein Kurvenverlauf mit einem Peak bei  $t_{18}$  und insgesamt auch etwas höheren Effluxwerten auf.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass apikal praktisch kein  ${}^{86}\text{Rb}$ -Efflux detektierbar bzw. provozierbar war. Der auf der basolateralen Seite gemessene Efflux war verhältnismäßig gering und ließ sich nicht durch die eingesetzten Kaliumkanalinhibitoren senken.

#### 4.2.6.3 Elektrophysiologische Untersuchungen mit Hilfe von Kaliumkanalinhibitoren

Zusätzlich wurde die Wirkung der Kaliumkanalinhibitoren auf den  $I_{\text{sc}}$  untersucht. Dabei führte eine apikale Applikation von 1 mM Chinin zu einem reversiblen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$ . Auffällig waren die Peaks beim Auswaschen der Substanz. Eine basolaterale Applikation von 1 mM Chinin führte zu einer irreversiblen elektrischen Irritation des Gewebes. Auch wenn das Gewebe apikal 10 mM  $\text{BaCl}_2$  ausgesetzt war, reagierte es mit einem reversiblen Stromanstieg vergleichbarer Größe. Die Peaks beim Auswaschen traten hier nicht auf. Eine basolaterale Applikation von 10 mM  $\text{BaCl}_2$  führte zu keinem einheitlichen Bild in der

Stromkurve. Es kamen sowohl Steigerungen wie auch Abfälle im  $I_{sc}$  vor, was insgesamt dazu führte, dass kein signifikanter Einfluss auf den  $I_{sc}$  nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde das Gewebe anscheinend weniger irritiert als es bei Chinin der Fall gewesen war.



**Abbildung 35:** Die Stromverläufe im Ussingkammerexperiment bei Einsatz von Kaliumkanalinhibitoren. 1 mM Chinin (A) führten ebenso wie 10 mM BaCl<sub>2</sub> (B) zu einem reversiblen Stromanstieg bei apikaler Gabe. Eine basolaterale Applikation der Substanzen führte nicht zu konstanten Ergebnissen. Beidseits wurde  $R_bERS$  verwendet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Physiologie des Ionentransports über das Epithel des Regenwurminteguments

#### 5.1.1 Natriumtransport

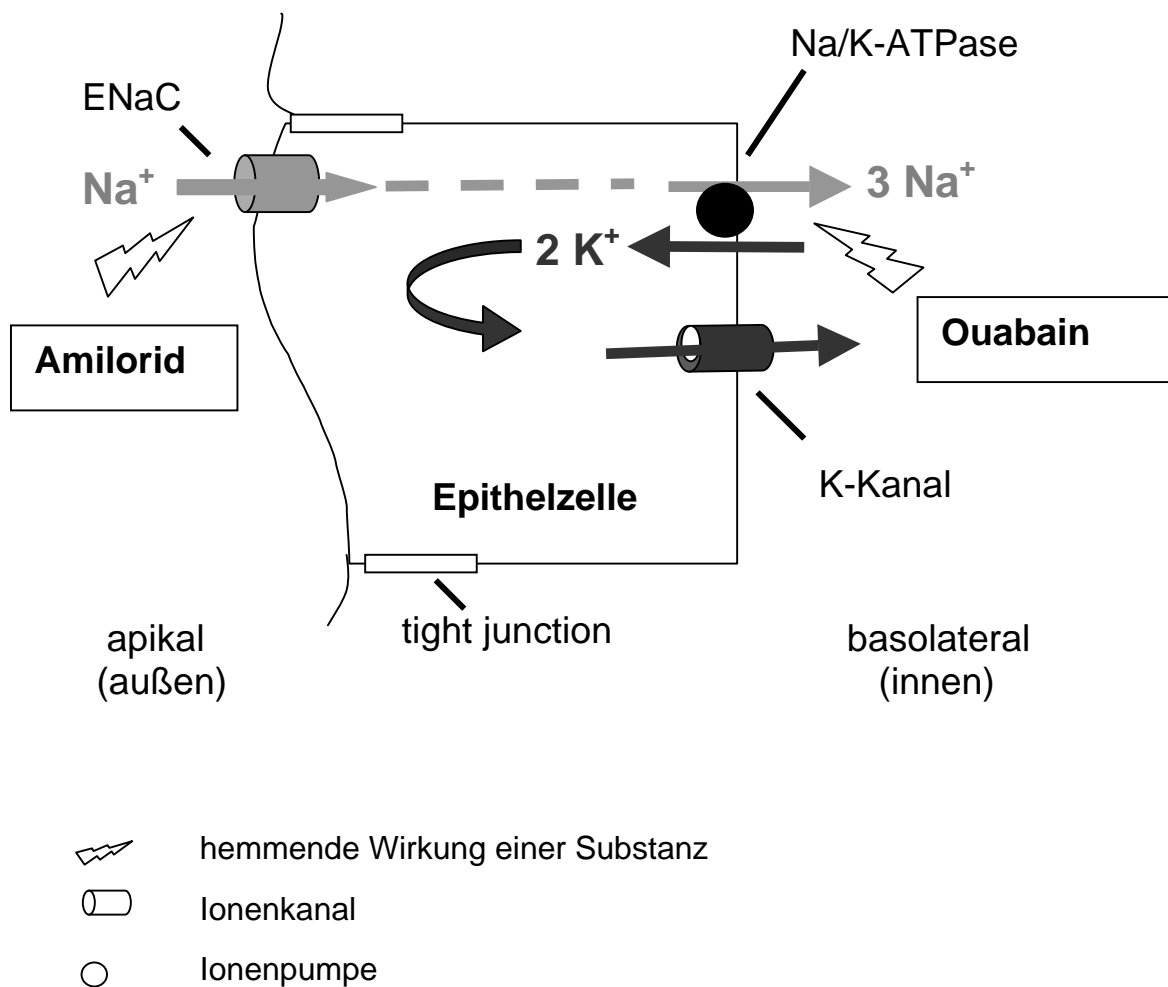
Epithelien sind Grenzgewebe, die zum einen eine Barrierefunktion eines Körpers gegenüber der Außenwelt darstellen können oder aber eine innere Kompartimentierung des Organismus gewährleisten. An Stellen, wo ein reger Stoffaustausch über das Epithel stattfinden soll, z.B. über Darmepithelien, sind die Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) zwischen den einzelnen Epithelzellen relativ durchlässig („leaky“). Dichte Epithelien, wie z.B. das der Haut, sind hingegen gekennzeichnet durch einen hohen elektrischen Widerstand. Ein parazellulärer Transport von Ionen wird durch die tight junctions größtenteils verhindert. Der Transport von gelösten Stoffen bzw. Ionen geschieht hier über besondere Membranproteine wie Ionenkanäle, -transporter und -pumpen.

Die apikalen, also nach außen zeigenden Membranen vieler dichter Epithelien weisen spezielle Natriumkanäle auf. Diese so genannten epithelialen Natriumkanäle, abgekürzt als ENaC, wurden erstmals 1951 von Hans Ussing funktionell beschrieben (Ussing and Zerahn 1951). Der Natrium-Transport ist dabei von außen, also vom umgebenden Medium, in die Zelle und auf der Gegenseite weiter ins Blut gerichtet.

Die Natriumabsorption über den ENaC geschieht ohne Kopplung an andere Ionen in Form eines Cotransports oder Antiports und auch ohne direkten Energieverbrauch. Vielmehr ist es so, dass der notwendige elektrochemische Gradient durch eine in der basolateralen Membran befindliche Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten wird. Nach dem von Koefod-Johnsen und Ussing (Koefod-Johnson and Ussing 1958) beschriebenen Modell des elektrogenen Natriumtransports stellt man sich das folgendermaßen vor: Als Triebkraft wirkt die basolaterale Natrium-Kalium-Pumpe, die ständig Natrium aus der Zelle heraus befördert. Im Gegenzug transportiert diese ATPase Kalium in die Zelle hinein, aber da die intrazelluläre Kalium-Konzentration höher ist als die extrazelluläre, wird es passiv wieder über Kaliumkanäle eliminiert. Weil Natrium aus der Zelle entfernt wird, ist diese bestrebt, neues Natrium aufzunehmen und so strömt das Kation entlang eines elektrochemischen Gradienten über den ENaC passiv in die Zelle ein. (vgl. Abb. 36)

Seit es gelungen war, den Kanal aus dem Rattencolon zu klonieren und in *Xenopus laevis* Oocyten zu exprimieren (Lingueglia, Renard et al. 1993; Lingueglia, Voilley et al. 1993; Canessa, Schild et al. 1994), konnte der Kanal molekular beschrieben werden. Er besteht aus 3 Untereinheiten (alpha, beta, gamma) die zu 70% homolog sind und je ca. 680 Aminosäuren aufweisen. Die beiden Transmembrandomänen M1 und M2 liegen in die

Zellmembran eingebettet. Nach außen zieht sich eine große extrazelluläre Schleife. Eine kleinere P-Schleife liegt zwischen den Transmembrandomänen und sowohl das Amino- als auch das Carboxy-Ende liegen intrazellulär. In die Zellmembran eingelagert bildet der ENaC sozusagen eine Pore, doch Unklarheit besteht noch über die tatsächliche Stöchiometrie. Favorisiert wird heute ein Modell, wonach der Kanal sich aus 4 Untereinheiten (2  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit) mit jeweils 2 Transmembrandomänen zusammensetzt (Shaohu, Li et al. 2000), durch den die  $\text{Na}^+$ -Ionen von außen nach innen strömen. Die Untereinheiten des Heterotetramers sollen dabei so angeordnet sein, dass sich die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten gegenüber liegen.



**Abbildung 36:** Modell des elektrogenen Natriumtransports modifiziert nach Koefod-Johnsen und Ussing (1958). Eine basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase generiert einen elektrochemischen Gradienten, der einen passiven Einstrom von  $\text{Na}^+$  durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) in der apikalen Zellmembran ermöglicht.

Aufgrund seiner zentralen Stellung im Rahmen der Natriumabsorption spielt der ENaC eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasser- und Elektrolythomöostase aller Vertebraten und vieler Invertebraten. Defekte in diesem System äußern sich in

unterschiedlichen Krankheitsbildern bei Mensch und Tier. Hingegen wurde der ENaC bisher weder in Bakterien, noch in Hefen, Protozoen oder Pflanzen nachgewiesen. Ein Grund hierfür ist vermutlich, dass die Einzeller nicht so deutlich polar aufgebaut sind und nicht über zwei funktionell getrennte Membranabschnitte verfügen wie z.B. Epithelzellen. Bei Pflanzen- und Bakterienzellen kommt noch hinzu, dass sie aufgrund ihrer starren Zellwände allgemein über andere osmoregulatorische Mechanismen verfügen als tierische Zellen.

### 5.1.2 Untersuchung des Epithelialen Natriumkanals (ENaC)

Der ENaC kann funktionell durch seine Blockierbarkeit mit Hilfe des kaliumsparenden Diuretikums Amilorid nachgewiesen werden. Diese Substanz wurde im Rahmen einer groß angelegten Untersuchung entdeckt, in der in den frühen fünfziger Jahren ein kaliumsparendes Diuretikum gesucht wurde, welches man mit den damals bekannten Thiazid-Diuretika gemeinsam verabreichen konnte. Man stieß bei dieser Studie auf 3-Amino-6-Bromo-N-(Diamino-Methylen)Pyrazin-Carboxamid. Dieses heterocyclische Pyrazin, gleichzeitig ein stabiles Acylguanidin und eine Base wirkte diuretisch, saliiuretisch und antikaliuretisch, und ist ein Derivat des heute therapeutisch eingesetzten Amilorids.

Untersuchungen ergaben, dass Amilorid die passive Natrium-Resorption durch Interaktion mit dem Epithelialen Natriumkanal im distalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere blockiert. Das entzieht Natrium dem Austauschmechanismus gegen Kalium (Natrium/Kalium-ATPase) in der basolateralen Zellmembran.

Als die Wirkung von Amilorid auf die Tubuluszellen in der Niere bekannt war, wurde seine Wirkung auf andere Epithelien untersucht. Beschrieben wurde der amiloridsensitive Natriumkanal seitdem in vielen verschiedenen Epithelien des Menschen und anderen Säugetieren, z.B.:

- Niere (Almeida and Burg 1982; Stanton 1989; Frindt, Sackin et al. 1990),
- Colon (Amasheh, Epple et al. 2000),
- Atemwege (Boucher and Gatzky 1983; Blank 1996),
- Schweißdrüsen (Quinton 1981).

Aber auch bei Amphibien wurde der Kanal entdeckt und erforscht, z.B. an:

- Froschhaut (Ussing and Zerahn 1951; Van Driessche and Lindemann 1979),
- Froschcolon (Krattenmacher and Clauss 1988),
- Froschlunge (Fischer, Van Driessche et al. 1989; Fronius, Berk et al. 2004),
- Harnblase der Kröte (Palmer, Edelman et al. 1980),

und auch bei Vögeln, z.B.:

- Coprodeum des Huhns (Bindslev, Cuthbert et al. 1982; Clauss, Dürr et al. 1987).

Auch bei Invertebraten sind amiloridsensitive Natriumkanäle bereits beschrieben, so z.B. in der Haut der Spritzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis* [Mollusca] (de With, Slootstra et al. 1988) oder bei der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* [Crustacea] (Zeiske, Onken et al. 1992). Aus der Fruchtfliege *Drosophila* [Insecta] wurden zwei ENaC-Orthologe kloniert (Darboux, Lingueglia et al. 1998). Geht man phylogenetisch noch weiter im Tierreich zurück, so stößt man bereits beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [Nematoda] auf Degenerine, die Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zum ENaC von



Vertebraten aufweisen. Sie gehören mit dem ENaC zu einer Protein-Superfamilie. Hier handelt es sich aber maximal um einen Prototyp des Natriumkanals, denn diese Degenerine sind vielmehr an der Mechanosensorik beteiligt als am Natriumtransport [vgl. review (Kellenberger and Schild 2002)].

Aber schon im nächst höheren Tierstamm, nämlich bei den Anneliden, kann man funktionell, wenn auch bisher nicht strukturell, amiloridsensitive Natriumkanäle nachweisen. Bisher wurde das vorwiegend am medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* erforscht (vgl. Kap. 2.2.1). An dieser Stelle setzte die vorliegende Arbeit an, in der ein amiloridsensitiver Natriumtransport bei einem weiteren Anneliden, *Lumbricus terrestris*, funktionell näher charakterisiert wurde. Die Tatsache, dass sich die Eigenschaften und auch die Struktur amiloridsensitiver Natriumkanäle im Laufe der Evolution nur wenig verändert haben, deutet darauf hin, dass es sich um eine evolutionär gesehen sehr alte Genfamilie handelt. Darin ist die Idee begründet, in der medizinisch-biologischen Grundlagenforschung phylogenetisch niedriger stehende Tiere zu untersuchen, um Hinweise auf komplexere physiologische Prozesse beim Vertebraten zu erhalten.

Eine wichtige Rolle für das Verhalten des ENaC und seine Ansprechbarkeit auf Amilorid spielt die Natriumkonzentration in der Lösung. So wird der amiloridsensitive Strom durch hohe Natriumkonzentrationen gehemmt. Erklärbar ist dieses Phänomen zum einen über eine mögliche kompetitive Hemmung mit einer Blockierung der Amilorid-Bindungsstelle durch Natriumionen. Es ist für einige Gewebe auch beschrieben, dass die Anzahl der ENaCs bei steigender Natriumkonzentration in der apikalen Lösung sinkt (downregulation) (Palmer, Sackin et al. 1998). Zum anderen ist ein negativer feedback-Mechanismus als Reaktion auf eine hohe intrazelluläre Natriumkonzentration denkbar, wobei die Kanäle offenbar innerhalb kürzester Zeit geschlossen werden können. Diese Regulationsmöglichkeiten sind gerade für ein im hypotonen Medium lebendes Tier wie den Regenwurm überlebenswichtig. Unter niedrigen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen ist der Wurm bestrebt, so viel wie möglich davon aufzunehmen, schon um dem chemisch-osmotischen Gradienten von basolateral nach apikal entgegenzuwirken. Setzt man dieses Tier plötzlich einer um ein Vielfaches höheren Natriumkonzentration aus, so besteht die Gefahr, dass extrem viele Kationen aufgenommen werden. Unkontrolliert würde das Wasser nach sich ziehen und die Zellen zum Schwellen bringen. So ist es auch erklärbar, warum die Stromkurve kaum eine Reaktion auf die Gabe von Amilorid auf das Gewebe zeigte, wenn sowohl basolateral als auch apikal hochkonzentrierte Natriumlösungen (ERS) verwendet wurden (Krumm 2002).

Symmetrische Versuchsbedingungen, also isoionische und isoosmotische Lösungen apikal und basolateral, werden aber von vielen Autoren bei elektrophysiologischen Messungen vorausgesetzt. Hintergrund der Überlegung ist, dass so ein Fluss von Ionen allein aufgrund unterschiedlicher Ionenkonzentrationen apikal und basolateral verhindert werden soll. Dies spielt jedoch hauptsächlich bei wenig dichten Epithelien eine Rolle, da hier ein parazellulärer Transport stattfinden würde, den das Gewebe nicht beeinflussen könnte. Lindley (Lindley and Hoshiko 1964) ist bei seinen elektrophysiologischen Versuchen am dichten Epithel der Froschhaut so vorgegangen, dass er symmetrische Lösungen mit „low

total cation“ und „high total cation“ Lösungen verglichen hat. Unter anderem hat er auch Versuche gemacht, bei denen er unter „low total cation“ Bedingungen die Osmolarität an die der basolateralen Flüssigkeit mit Hilfe von Mannitol angeglichen hat. Im Endeffekt entschied er sich für die für den im Frischwasser lebenden Frosch natürlichsten Bedingungen, also niedrige Osmolarität außen, blutisotone Lösung innen.

Auch in der vorliegenden Studie wurde dem Gewebe eine möglichst physiologische Umgebung angeboten, also außen niedrigere Salzkonzentrationen (künstliches Teichwasser, PW) als innen (Regenwurm-Ringer-Lösung, ERS). Im Falle des ultradichten Regenwurmepithels finden sicherlich so gut wie alle Transportprozesse über Membranproteine in der apikalen bzw. der basolateralen Zellmembran statt, so dass die Ergebnisse nicht durch einen passiven Ausgleich von Konzentrationsgradienten per diffusionem beeinflusst werden. Es ist aber zu beachten, dass alle Versuchsergebnisse immer unter den gegebenen Bedingungen zu interpretieren sind. Das gilt besonders dann, wenn Ergebnisse von verschiedenen Autoren oder unterschiedlichen Geweben verglichen werden sollen.

Wie oben bereits erwähnt ist die Substanz Amilorid ein wichtiges Werkzeug der Physiologie, wenn es darum geht, den ENaC in einem Gewebe funktionell nachzuweisen bzw. zu blockieren. Einigkeit herrscht darüber, dass der Effekt dieses Natriumkanal-inhibitors auf ein Gewebe, welches den ENaC enthält, schnell und reversibel sowie dosisabhängig ist (Feldmann and Drewnowska 1992). Diese Dosisabhängigkeit war in der vorliegenden Arbeit Gegenstand der Untersuchung. Als Richtlinie sind hochaffine Epitheliale Natriumkanäle mit  $K_{1/2} < 1 \mu\text{M}$  für Amilorid beschrieben und niedrigaffine Epitheliale Natriumkanäle mit  $K_{1/2} > 1 \mu\text{M}$  (Young and Benos 1992).

Die hier vorgestellten Versuche ergaben eine halbmaximale Hemmkonzentration (bezogen auf den amiloridsensitiven Strom) für Amilorid auf Regenwurmhaut von  $K_{1/2} = 1,28 \pm 0,08 \mu\text{M}$ . Dieser Wert liegt knapp über der von Young gezogenen Grenze von  $1 \mu\text{M}$ , was demnach für einen niedrigaffinen Typ des epithelialen Natriumkanals in diesem Gewebe spricht. Allerdings ist der Wert deutlich niedriger als der von Weber ermittelte  $K_{1/2}$  von  $2,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$  beim Blutegelintegument (Weber, Blank et al. 1995). Abb. 10 A im Ergebnisteil zeigt, dass der amiloridsensitive Strom nicht in jedem Fall dem Gesamtnatriumstrom entsprach. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass am Regenwurmintegument mehr als nur ein Transportsystem für Natrium vorkommt, wobei hier z.B. ein Natrium/Kalzium-Austauscher in Frage kommt. Im ersten Fall, wo der amiloridsensitive Strom gleich dem Gesamtnatriumstrom war, wäre davon auszugehen, dass dieser zweite Natriumtransporter gerade nicht aktiv war.

Zusätzlich zur Stammsubstanz Amilorid können verschiedenste Derivate synthetisch hergestellt werden. Etwa 1.000 solche Derivate des Amilorids sind beschrieben, und besonders interessant waren hierbei Veränderungen an der Guanidingruppe, der 5-Aminogruppe des Pyrazinringes sowie am Substituenten an Position 6 des Pyrazinrings (Simchowitz, Kleyman et al. 1992).

Die Substitution eines Benzyl- oder Phenylrestes an die terminale Aminogruppe der Guanidingruppe, führt zu einer deutlichen Steigerung der Potenz der so entstandenen Derivate Benzamil und Phenamil, verglichen mit der Grundsubstanz Amilorid. Eine unsubstituierte 5-Aminogruppe am Pyrazinring ist wichtig für die Blockierung des ENaC. Unabhängig von der Art des Substituenten führen alle außer Wasserstoff zu einem Verlust an Aktivität. Eine optimale Wirkung auf den ENaC können die Derivate weiterhin nur haben, wenn Position 6 am Pyrazinring mit Chlorid als Liganden belegt ist.

Das Amilorid-Analog Benzamil war in der vorliegenden Arbeit in der Lage, schon in geringen Dosen (1  $\mu\text{M}$ ) einen Teil des Natriumstroms zu hemmen, der von Amilorid selbst in höheren Dosen (50  $\mu\text{M}$ ) nicht beeinflusst wurde. Die Tatsache, dass durch ein Umsteigen auf Natrium-freies PW in der apikalen Hälfte der Ussingkammer nach der Amiloridgabe eine weitere Stromsenkung möglich war, deutet darauf hin, dass mindestens ein weiteres Natrium-Transportsystem aktiv war (s.o.). Benzamil wirkte offensichtlich hemmend auf beide Systeme. Dieser Effekt konnte auch am Blutegel gezeigt werden (Blank 1994). Es ist bekannt, dass Benzamil weniger spezifisch auf den ENaC wirkt als Amilorid und dafür zusätzlich eine hemmende Wirkung auf einen Natrium/Kalzium-Austauscher hat (Kaczorowski 1992; Simchowicz, Kleyman et al. 1992). Die Ergebnisse sprechen also dafür, dass dieser Austauscher in der Regenwurmhaut vorkommen könnte. Ein sichtbarer Effekt auf andere bekannte Transportsysteme wie z.B. Natrium/Aminosäure- bzw. Natrium/Glukose-Cotransporter scheiden in diesen Versuchen schon aufgrund der Zusammensetzung der apikalen Lösung aus. Im Übrigen erklärt sich auch der sehr niedrige  $K_{1/2}$ -Wert von Benzamil (0,06  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu Amilorid (1,28  $\mu\text{M}$ ) teilweise durch die Blockierung gleich mehrerer Natrium-Transportsysteme und spricht nicht nur für eine höhere Affinität des Moleküls gegenüber dem ENaC. Würden hingegen Versuche auf der Basis von Einzelkanalableitungen gemacht, fielen die Effekte durch Überlagerung von verschiedenen Transportsystemen weg.

Auch bei Versuchen mit Phenamil bestätigte sich die aufgrund des Molekülaufbaus vermutete stärkere Wirksamkeit hinsichtlich der Hemmung des ENaC im Vergleich zum Amilorid. Phenamil hat ebenso wie Benzamil eine Substitution an der terminalen Aminogruppe der Guanidingruppe. Trotz dieser strukturellen Parallelen zum Benzamil hemmt Phenamil jedoch offensichtlich nur den vom ENaC getragenen Teil des  $I_{\text{sc}}$ . Hier ist also die Affinität zum ENaC tatsächlich höher als beim Amilorid, wodurch sich der niedrigere  $K_{1/2}$ -Wert (0,53  $\mu\text{M}$ ) erklärt. Interessant ist, dass Phenamil in der Literatur als irreversibler Hemmer des ENaC am Epithel der Krötenharnblase beschrieben wird (Garvin 1985). Am Regenwurmintegument, das ebenso wie die Krötenblase ein ultradichtes Epithel darstellt, war der Phenamileffekt vollkommen reversibel. Im Weiteren wären Untersuchungen an anderen amiloridsensitiven Geweben hinsichtlich dieser Fragestellung von Interesse. Eine Erklärung für das Phänomen wäre z.B. das Vorkommen unterschiedlicher ENaC-Typen mit variierenden Phenamil-Bindungsstellen. Eventuell verwendete Garvin auch einen anderen Lösungsvermittler als DMSO, oder andere abweichende Versuchsbedingungen waren für die Unterschiede in den Ergebnissen verantwortlich.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass es für die Wirkung auf den ENaC wichtig ist, dass die 5-Aminogruppe am Pyrazinring nicht substituiert ist. Das ist beim Amilorid-Derivat EIPA aber der Fall. So war der in der vorliegenden Studie im Vergleich zum Amilorid und erst recht im Vergleich zu Benzamil und Phenamil gefundene höhere  $K_{1/2}$ -Wert (3,09  $\mu\text{M}$ ) zu erwarten. EIPA wirkt in geringen Dosen ( $< 10 \mu\text{M}$ ) spezifisch auf den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher. Dieser Antiporter kommt aber eher in wenig dichten („leaky“) Epithelien vor (Feldmann and Drewnowska 1992). In den beschriebenen Versuchen wurde EIPA in Konzentrationen zwischen 0,2  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Der relativ flache Verlauf der Kinetikkurve lässt sich somit durch eine niedrigere Affinität der Substanz gegenüber dem ENaC und eher nicht durch eine Wirkung auf einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine vergleichende Charakterisierung der epithelialen Natriumkanäle in der vorliegenden Arbeit über pharmakokinetische Untersuchungen von Amilorid und seinen Derivaten Benzamil, Phenamil und EIPA geschah, wobei die halbmaximalen Hemmkonzentrationen bestimmt wurden. Aus den Kinetiken aller vier Substanzen resultierte ein Affinitätsprofil von Benzamil  $>$  Phenamil  $>$  Amilorid  $>$  EIPA. Sowohl dieses Profil also auch die halbmaximale Hemmkonzentration von Amilorid auf Regenwurmhaut sind typisch für Epitheliale Natriumkanäle, wie sie auch bei Vertebraten vorkommen (Cragoe, Kleyman et al. 1992).

### 5.1.3 Hormonelle Regulation des Natriumtransports

Die oben diskutierten Ergebnisse deuten also an, dass das Epithel der Regenwurmhaut einen typischen Epithelialen Natriumkanal aufweist. Das ist besonders interessant, weil die Anneliden somit der niedrigste Tierstamm sind, in dem dieser Kanal funktionell gezeigt werden kann. Bei den Vertebraten, und gerade beim Menschen, sind Fehlfunktionen des ENaC für schwerwiegende Krankheitsbilder (z.B. vererbte Formen der Bluthochdruck-erkrankung) verantwortlich. Daher besteht ein Interesse an der Grundlagenforschung über diesen Ionenkanal.

Nun ist es so, dass bei Vertebraten vor allem das Steroidhormon Aldosteron für die Regulation des ENaC verantwortlich ist, aber auch Peptidhormone wie das Vasopressin (also das antidiuretische Hormon, ADH) sind involviert [review: (Claus 1989)]. Aldosteron ist als Steroidhormon in der Lage, die Zellmembran zu passieren und wirkt klassischer Weise über die Aktivierung von Genen im Zellkern, die für so genannte Aldosteron-induzierte Proteine (AIPs) kodieren. Diese sind unter anderem am „Trafficking“ der ENaC-Untereinheiten beteiligt. Dieser Langzeitwirkung des Aldosterons mit einem Einbau neuer Kanäle in die Membran steht eine schnelle Wirkung des Steroids gegenüber, die zu einer Erhöhung der Aktivität der bestehenden ENaCs führt. Hier wird neuerdings eine Steroidhormonwirkung über Membranrezeptoren diskutiert (Schafer 2002).

Eine solche Wirkung über membranständige Rezeptoren ist ansonsten typisch für Peptidhormone, welche nicht selbst in die Zelle eindringen können. An der Regulation des Salz-/Wasserhaushalts von Wirbeltieren sind aus der Gruppe der Peptidhormone vor allem Vertreter der Oxytocin-/Vasopressin-Familie beteiligt. Diese Peptidhormone werden von hypothalamischen Kerngebieten synthetisiert, entlang der Nervenverbindungen in den Hypophysenhinterlappen (HHL) transportiert, dort gespeichert und bei Bedarf ins Blut sezerniert. In der Körperperipherie wirken sie auf die Wasserpermeabilität epithelialer Membranen (terminale Abschnitte des Nephrons beim Säuger, aber auch Krötenblase und Froschhaut), auf die Muskulatur des Uterus, auf die Milchausführungsgänge der Brustdrüse und (in entsprechend hohen Dosen) auf die glatte Muskulatur der Gefäße ein. Die wasserpermeabilitätsfördernde Wirkung der HHL-Hormone tritt erstmals bei Amphibien in Erscheinung. Bei primitiven Fischen kann Arg-Vasotocin unter Umständen sogar einen diuretischen Effekt auslösen (Hierholzer and Neubert 1977).

Durch die Analyse von Hirnanhangsdrüsenextrakten von vielen verschiedenen Vertebratenspezies wurden sieben natürlich vorkommende, biologisch aktive Peptide beschrieben, die der Oxytocin-/Vasopressin-Familie zuzurechnen sind (vgl. auch Tab. 5). Aus der Gruppe der vasopressorisch-antidiuretischen Peptide sind das: das bei Mensch, Pferd, Rind und Schaf vorkommende 8-Arg-Vasopressin, die 8-Lys-Variante von Schwein und Nilpferd sowie das Arginin-Vasotocin von Huhn, Amphibien und Fischen. Letzteres erhielt seinen Namen, weil es die Ringstruktur vom Oxytocin und die Seitenkette vom Vasopressin hat. Aus der Gruppe der oxytocinähnlichen Peptide unterscheidet man das Oxytocin der Säuger und Vögel, das Isotocin der Fische, das Glumitocin einiger primitiver

Fische und ferner das bei Amphibien, Reptilien und primitiven Fischen vorkommende Mesotocin. Der Prototyp liegt wohl beim Arg-Vasotocin oder beim Glumitocin. 1949 wurde Oxytocin erstmals rein gewonnen, ein Jahr später klärte Vincent du Vigneaud die Struktur auf und 1953 gelang ihm die Synthese von Hypophysenhinterlappen-Hormonen. Es handelt sich um Nonapeptide, bestehend aus einem von sechs Aminosäuren gebildeten Ring, der durch die Disulfidbrücke von zwei Cystinmolekülen geschlossen wird, und einer Seitenkette, die drei Aminosäuren umfasst. Häufig werden diese Hormone auch als Oktapeptide beschrieben, was damit zusammenhängt, dass man die zwei Cysteinmoleküle auch als ein Cystinmolekül ansprechen kann. Die Anwesenheit der Disulfidbrücke ist für die Hormonaktivität von ausschlaggebender Bedeutung.

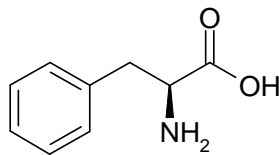
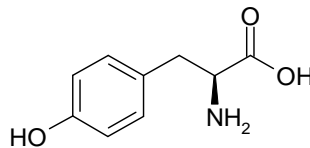
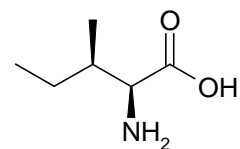
Inzwischen gibt es unzählige künstliche Analoge (Walter, Rudinger et al. 1967). An jeder Position im Peptid können Aminosäuren ausgetauscht, hinzugefügt oder entfernt werden. Viele Modifikationen führen zum Verlust der typischen Hormonwirkung. Einige jedoch bewirken sogar eine Wirkungssteigerung oder einen Wechsel von der antidiuretischen hin zur oxytocinähnlichen Wirkung oder umgekehrt. Besonders interessant sind Variationen an Position 3, 4, 5 und 8. An Position 3 kommen auch natürliche Variationen vor. Das Isoleucin der Oxytocine ist bei den vasopressinähnlichen Peptiden durch Phenylalanin ersetzt, was zu einer Zunahme der antidiuretischen Wirkung führt. An Position 4 kommen natürlicherweise entweder Serin (bei Isotocin und Glumitocin) oder Glutamin vor. Diese Modifikationen haben jedoch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit. Der wohl wichtigste Lokus der Hormonaktivität ist Position 5. Alle Aminosäuren außer Asparagin führen zu einer schlechteren Wirkung bzw. Wirkverlust. Die achte Aminosäure im Peptid ist ausschlaggebend für das Ansprechen der spezifischen Hormonrezeptoren (s.u.).

Auch bei Invertebraten sind Peptide beschrieben, die sich zur Gruppe der oxytocin-/vasopressinähnlichen Hormone rechnen lassen. Wie in der Literaturübersicht beschrieben (Kap. 2.3.3), entstammen beim Regenwurm die Peptidhormone, die den Salz-Wasser-Haushalt regulieren, offenbar ebenfalls aus den Kopfganglien. Die Invertebratenpeptide weisen eine hohe strukturelle Homologie zu den Vertebratenhormonen auf, und so unterscheidet sich das Molluskenpeptid 8-lys-Conopressin nur in drei Aminosäuren vom Oxytocin der Säugetiere und das aus dem Regenwurm isolierte Annetocin stimmt in fünf von neun Aminosäuren mit Oxytocin bzw. mit Vasopressin überein (vgl. Tab. 5). Da die Anneliden also über vergleichbare Peptidhormone verfügen, nicht jedoch über das Aldosteronsystem, ist es möglich, am Epithel des Regenwurms die Regulation des ENaC ohne den Einfluss von Aldosteron zu untersuchen. Dabei ist zu bedenken, dass es nicht möglich ist, eine Aldosteron-knock-out-Maus zu generieren. Sie wäre nicht lebensfähig. Der Regenwurm hingegen ist sozusagen ein natürlicher Aldosteron-knock-out-Organismus.

So konzentrierten sich in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zur Regulation des ENaC beim Regenwurm auf verschiedene Hormone aus der Gruppe der oxytocinähnlichen und der vasopressorisch-antidiuretischen Peptide. In den beschriebenen Versuchen (Kap. 4.3.4) war es dabei so, dass alle getesteten Peptidhormone zwar keinen signifikanten Einfluss auf den Gesamtstrom hatten, wohl aber auf den amiloridsensitiven Strom. Das

deutet eine Interaktion der durch die Hormone ausgelösten Effekte mit dem amiloridsensitiven Natriumkanal an, und somit auch eine Involvierung in die Regulation des Salz-/Wasser-Haushaltes des Regenwurms. Es fiel auf, dass fast alle Hormone den amiloridsensitiven Strom um 10-20 % gegenüber den Ausgangsbedingungen senkten. Dabei wirkten Vertebratenpeptide qualitativ ebenso wie das Regenwurmhormon Annetocin, was vermutlich mit der starken phylogenetischen Konservierung der Struktur zusammenhängt. Nur ein Peptid steigerte den amiloridsensitiven Strom, und zwar das 8-lys-Conopressin. Ein Vergleich der Primärstrukturen der Peptide ergab, dass nur dieses Peptid eine aliphatische Aminosäure (Isoleucin) an Position 2 im Molekül hatte, während alle anderen eine aromatische Aminosäure (Tyrosin oder Phenylalanin) an dieser Stelle aufwiesen (vgl. Abb. 37). Das führte zu dem Verdacht, dass dieser strukturelle Unterschied für den abweichenden Hormoneffekt verantwortlich war.

Allerdings zeigte sich nach Synthetisierung eines Conopressins mit einer aromatischen Aminosäure an Position 2 (2-tyr-8-lys-Conopressin), dass dies nicht der Fall war. Auch nach Substitution von Isoleucin durch Tyrosin stimulierte Conopressin den amiloridsensitiven Strom. Nähere Aufschlüsse könnte eventuell der Einsatz einer Technik zum „molecular modelling“ geben. Damit könnte ermittelt werden, ob die dreidimensionale Struktur des Conopressins gegenüber den anderen Peptiden stark abweicht, und ob eventuell funktionelle Gruppen bzw. Bindungstaschen hier maskiert sind.

**Phe****Tyr****Ile**

**Abbildung 37:** Phenylalanin (Phe) und Tyrosin (Tyr) sind neutrale Aminosäuren, die über einen Phenylring verfügen. Sie unterscheiden sich lediglich in einer Hydroxylgruppe. Im Gegensatz dazu ist Isoleucin (Ile) eine neutrale Aminosäure, die jedoch über keinen Phenylring verfügt.

Auch eine Verdopplung oder Halbierung der eingesetzten Hormonkonzentration hatte bei den Versuchen mit Conopressin kein qualitativ anderes Ergebnis zur Folge; der amiloridsensitive Strom stieg jeweils gegenüber der Kontrollgruppe an. Hingegen zeigte sich in den entsprechenden Versuchen beim Oxytocin durchaus eine Dosisabhängigkeit dahingehend, ob der amiloridsensitive Strom stieg oder fiel. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass viele Autoren Oxytocin als ein antidiuretisches Hormon bezeichnen (Saunders and Munsick 1966; Lyness, Robinson et al. 1985; Chou, DiGiovanni et al. 1995), wohingegen viele andere von einem diuretischen/natriuretischen Effekt sprechen

(Huang, Lee et al. 1995; Sjoquist, Huang et al. 1995; Huang, Lee et al. 1996; Gimpl and Fahrenholz 2001). Eine solche Dosisabhängigkeit ist z.B. auch für Mesotocin, ebenfalls ein Oxytocinanalogue, beim Huhn beschrieben (Takahashi, Kawashima et al. 1995). Hier bewirkten niedrige Dosierungen (0,25 µg/kgKM) des Hormons eine Verminderung des Urinflusses, wohingegen höhere Konzentrationen (> 2,5 µg/kgKM) eine starke Diurese bewirkten. In der Folge wäre nun zu klären, ob die anderen Peptidhormone beim Regenwurm auch eine dosisabhängige Wirkung auf den amiloridsensitiven Strom aufweisen. Innerhalb des Tierreichs ist es durchaus nachvollziehbar, dass ein und dieselbe Substanz gegenläufige Effekte bewirkt, denn häufig unterscheiden sich die Lebensräume und Lebensweisen der Tiere ganz erheblich, was eine Anpassung erforderlich macht. Die Tatsache, dass ein Molekül innerhalb eines Organismus unterschiedliche Wirkungen aufweist, ist ebenfalls weit verbreitet und kann z.B. durch eine Kopplung von Rezeptoren an unterschiedliche second-messenger-Systeme in verschiedenen Geweben erreicht werden.

Wie oben bereits erwähnt, ist bei Vertebraten die Position 8 in den Peptiden der Oxytocin/Vasopressin-Familie variabel. Die Natur der mittleren Aminosäure der Seitenkette ist dabei aber wesentlich für die Wirkungsqualität der HHL-Hormone. Die vasopressorisch-antidiuretischen Hormone haben eine basische Aminosäure an der vorletzten Position der Seitenkette, wohingegen es eine neutrale Aminosäure bei den oxytocinähnlichen Peptiden ist. Dieser Unterschied in den Aminosäuren führt bei den Vertebraten dazu, dass Oxytocin und Vasopressin unterschiedliche Rezeptoren ansprechen und somit eine unterschiedliche Funktion ausüben können. So vermittelt der Vasopressinrezeptor V<sub>1a</sub> einen glycogenolytischen Effekt und V<sub>1b</sub> eine Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Eine Stimulation des Vasopressinrezeptors V<sub>2</sub> führt zu einer antidiuretischen Wirkung des Hormons und der Oxytocinrezeptor vermittelt vorwiegend reproduktionsspezifische Effekte (Uteruskontraktion, Milchejektion). Als second messenger fungieren dabei in der Regel Inositoltriphosphat und Kalzium, nur bei V<sub>2</sub> ist es die Adenylatcyclase. Im Gegensatz dazu ist davon auszugehen, dass es bei vielen Invertebraten noch keine Auftrennung in oxytocin- bzw. vasopressinähnliche Hormone gibt. Das ist vermutlich erst in phylogenetisch höheren Tieren durch Genduplikation geschehen. Für die Schnecke *Lymnea stagnalis* [Mollusca] ist ein möglicher Vorläufer der Oxytocin-/Vasopressinrezeptoren beschrieben (van Kesteren, Tensen et al. 1996), der nicht hinsichtlich der achten Aminosäure im Peptid unterscheidet.

Ein solcher „unspezifischer“ Rezeptor ist auch im Regenwurm zu erwarten, da in der vorliegenden Studie alle getesteten Peptide - mit Ausnahme des Conopressins (s.o.) - der Oxytocin/Vasopressin-Familie einen qualitativ gleichwertigen Effekt auf den amiloridsensitiven Strom hatten. Ebenfalls für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass der Annetocin-Effekt auf den amiloridsensitiven Strom durch den Einsatz einer Substanz verhindert werden konnte, die lediglich die Ringstruktur des Oxytocins darstellte (tocinoic acid). Diese Substanz wirkte vermutlich kompetitiv mit Annetocin am Rezeptor, blockierte diesen und konnte aufgrund des Fehlens der Seitenkette keine spezifische Hormonwirkung ausüben.



Allgemein lässt sich bisher zusammenfassen, dass eine Regulation der Natriumabsorption über den ENaC zum einen direkt am Kanal erfolgen kann (Agonisten/Antagonisten, Ionenkonzentration im Medium). Eine andere Möglichkeit besteht in der Modifikation der Anzahl der Kanäle pro Membranfläche. Eine solche Wirkung auf den Kanal ist z.B. für das Peptidhormon Vasopressin bei Vertebraten beschrieben (Clauss 1989). Um diesen Punkt an der Haut des Regenwurms näher zu untersuchen, könnte z.B. die Technik der Rauschanalyse (noise analysis) angewendet werden. An der Haut des Blutegels wurde diese Technik bereits erfolgreich durchgeführt (Weber, Dannenmaier et al. 1993).

### 5.1.4 Kalium- und Chloridtransport

Neben den Untersuchungen zum Natriumtransport wurden in dieser Studie auch Versuche zum Transport von Kalium über das Epithel gemacht. In Experimenten war dabei aufgefallen, dass der Strom bei apikaler Elimination von Kalium (KCl) anstieg. Es gab Anhaltspunkte, dass hierfür ein in der apikalen Membran vorkommender Na/K/2Cl-Cotransporter verantwortlich war. Dieser Cotransporter kann durch bestimmte Diuretika spezifisch inhibiert werden. Furosemid z.B. wirkt in der Henle'schen Schleife der Niere bei Vertebraten und ist ein weit verbreitetes Entwässerungsmedikament in der Human- und Tiermedizin.

Eine Wirkung von Furosemid auf die transepitheliale Potenzialdifferenz der Regenwurmhaut wurde bereits von Prusch beschrieben (Prusch und Otter 1977). Er stellte eine reversible Depolarisierung der transepithelialen Potenzialdifferenz bei apikaler Applikation von 100  $\mu$ M Furosemid auf das Gewebe fest. Im Weiteren fand er, dass Furosemid den unidirektionalen Chloridinflux um mehr als 20 % senkte. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Substanz auf die elektrophysiologischen Parameter und hier v.a. auf den Strom untersucht. Obwohl der Na/K/2Cl-Cotransporter an sich elektroneutral arbeitet, da er gleich viele negative wie positive Ladungen in die Zelle transportiert, stieg der Gesamtstrom über das untersuchte Gewebe bei einer apikalen Perfusion mit 100  $\mu$ M Furosemid reversibel an. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass bei einer Hemmung des Na/K/2Cl-Cotransporters durch Furosemid weniger negativ geladene Chloridionen von apikal nach basolateral transportiert werden. Der Strom wird hierdurch weniger negativ. Gleichzeitig gelangen aber die positiv geladenen Natrium- und Kaliumionen weiterhin durch andere Kanäle (z.B. Natrium über den ENaC) in die Zelle.

Bumetanid, welches im Allgemeinen eine höhere Affinität zum Na/K/2Cl-Cotransporter haben soll (Brater, P. et al. 1983), zeigte am Integument des Regenwurms nur eine mit Furosemid vergleichbare Wirkung auf den  $I_{sc}$ .

Entzieht man der apikalen Lösung das Kalium, so führt das zu einer Inhibition des Cotransporters, da er auf alle drei Ionen angewiesen ist. Im Strom zeigte sich ein mit der Wirkung der oben beschriebenen Schleifendiuretika vergleichbarer Anstieg. Somit konnte, basierend auf drei Versuchsansätzen, ein Hinweis auf das Vorkommen des Na/K/2Cl-Cotransporters gefunden werden. Damit steht dem Epithel der Regenwurmhaut ein weiterer Mechanismus zur Absorption von Natrium zur Verfügung, und auch eine apikale Aufnahme von Kalium- und Chloridionen ist so möglich.

In der basolateralen Membran des Epithels des Regenwurminteguments wird eine Na/K-ATPase vermutet, da sich im Strom deutliche Effekte auf die Gabe von Ouabain hin zeigten (Krumm 2002). Somit wird Kalium auch über die basolaterale Membran dieses Gewebes aufgenommen.

Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse anhand der Versuche mit dem radioaktiven Isotop  $^{86}\text{Rb}$ , welches anstelle von Kalium eingesetzt wurde. Versuche hatten gezeigt, dass

das Gewebe sehr gut mit dem Isotop belud, wenn das Isotop von beiden Gewebseiten angeboten wurde, aber auch, wenn es nur von apikal oder nur von basolateral appliziert wurde. Das spricht für das Vorkommen von Aufnahmemechanismen für Kalium in beiden Membranen. Parazelluläre Transportmechanismen sind bei dem dichten Epithel der Regenwurmhaut vernachlässigbar.

Ein Efflux des Isotops konnte nur über die basolaterale Membran gemessen werden. Apikal war kein Efflux erkennbar, auch nicht bei Inkubation in einem hypotonem Medium. Es ist eigentlich anzunehmen, dass die Zellen im hypotonen Medium schwellen und durch Veränderungen im Zytoskelett Ionenkanäle geöffnet werden. Das ist ein phylogenetisch alter Mechanismus um Kanäle zu öffnen. Es ist somit davon auszugehen, dass in der apikalen Membran keine Kanäle enthalten sind, die Kalium aus der Zelle herauslassen. Aber eventuell verhindert auch die Cuticula, die fest mit den Epithelzellen verbunden ist, eine Zellschwellung. Der basolaterale Efflux von  $^{86}\text{Rb}$  war verglichen mit anderen Geweben sehr gering. Bei Verwendung des gleichen Protokolls konnte am Rattencolon ein Efflux von ca. 3 % (Ribeiro, Heinke et al. 2001; Diener 2003) verglichen mit ca. 0,5 % an der Regenwurmhaut ermittelt werden. Dafür könnten die dem Regenwurmepithel anhaftenden Muskelschichten verantwortlich sein. Das Epithel selbst macht nur ca. 10 % des Gesamtgewebes aus. Im Gegensatz zu einigen Geweben bei Vertebraten, wo die Muskelschicht vom restlichen Gewebe getrennt werden kann („strippen“), ist das einschichtige Epithel der Regenwurmhaut nicht von der Ring- und Längsmuskulatur abstreifbar, da eine dazwischen liegende Bindegewebsschicht bei den Anneliden grundsätzlich fehlt. Es ist nicht klar, inwieweit die Muskeln zum einen als Diffusionsbarriere wirken und zum anderen ob die Muskeln auch mit dem Isotop beladen werden und einen eigenen Efflux haben.

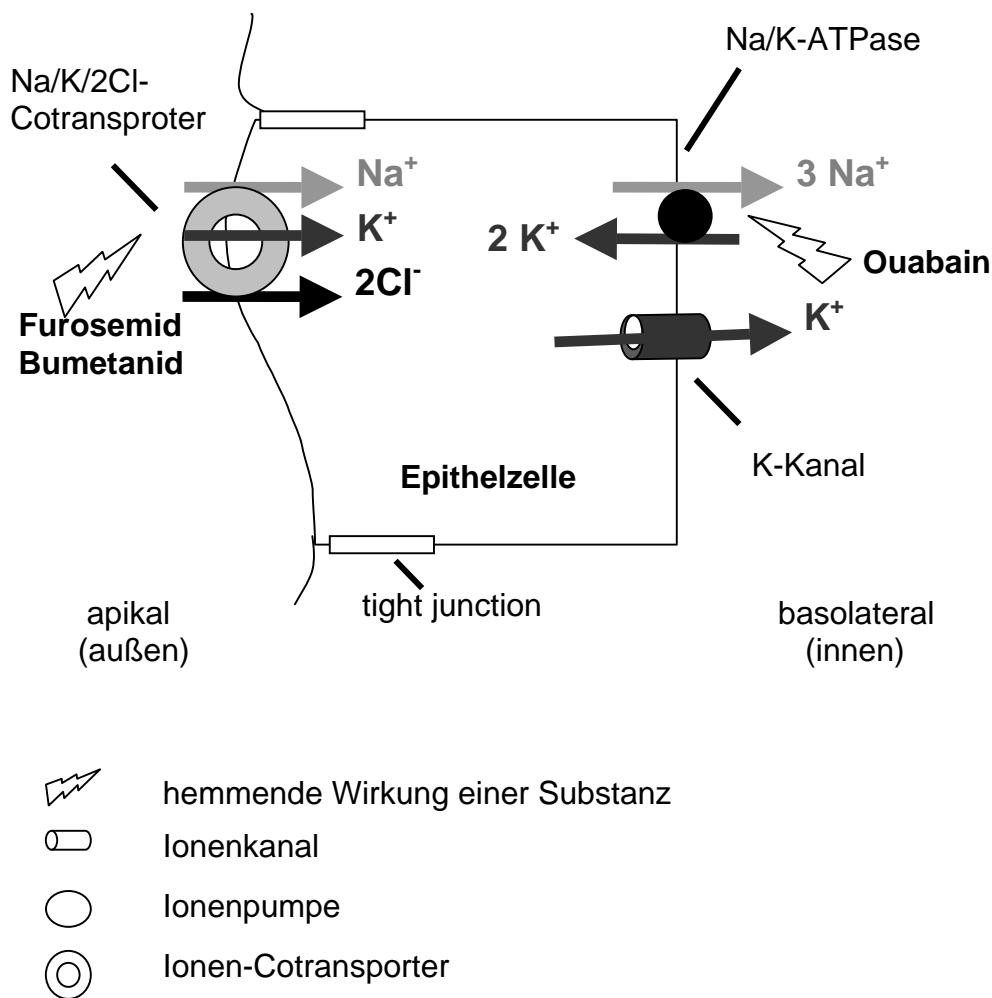
Die Tatsache, dass bei einer rein apikalen Beladung des Gewebes mit dem Isotop ein basolateraler Efflux detektierbar war, spricht für eine Absorption über die apikale Membran in die Zelle und über die basolaterale Membran weiter ins Blut. Auch wenn die gemessenen basolateralen Effluxe gering sind, so ist doch damit zu rechnen, dass in der basolateralen Membran Kaliumkanäle enthalten sind. Da sowohl apikal als auch basolateral Aufnahmemechanismen für Kalium vorhanden sind, muss es zumindest in einer Membran die Möglichkeit zur Elimination des Alkalimetalls geben.

Bei allen Ergebnissen aus den Effluxversuchen ist im Hinterkopf zu behalten, dass Rubidium eventuell doch auch andere Transportwege als Kalium benutzt. Es wäre sinnvoll, die Ergebnisse mit dem radioaktiven Isotop  $^{42}\text{K}$  zu verifizieren. Das ist allerdings nicht ganz unproblematisch, da es nur eine Halbwertszeit von 12,36 Stunden hat. Im Vergleich dazu hat  $^{86}\text{Rb}$  eine Halbwertszeit von 18,65 Tagen.

Die Tatsache, dass bei Verwendung von Chinin und  $\text{BaCl}_2$  als Kaliumkanalinhibitoren basolateral kein Effekt auf den  $^{86}\text{Rb}$ -Efflux zu verzeichnen war, kann wiederum mit den anhaftenden Muskelschichten in Verbindung stehen, die unter anderem als Diffusionsbarriere wirken. Des Weiteren sind die beiden Substanzen recht unspezifisch in ihrer Wirkung. Es kann aber auch sein, dass die Kaliumkanäle dieses phylogenetisch sehr

niedrigen Tierstammes anders als die von Vertebraten beschaffen sind. Apikal konnte aufgrund des sowieso kaum vorhandenen Effluxes kein Effekt gesehen werden. Interessant ist die Wirkung von  $\text{BaCl}_2$  und Chinin auf den  $I_{\text{sc}}$  in elektrophysiologischen Experimenten. Der bei apikaler Gabe der Substanzen zu verzeichnende Anstieg des Stroms kann eine vermehrte Resorption von Kationen oder die Hemmung einer Sekretion von Kationen bedeuten. Letzteres könnte für eine Blockierung von auswärts-gerichteten Kaliumkanälen sprechen, was aber in Diskrepanz zu den Ergebnissen der Effluxversuche steht. Bei basolateraler Applikation der Kaliumkanalinhibitoren konnte kein einheitlicher Effekt auf den Strom gezeigt werden, wofür die oben bereits genannten Gründe in Frage kommen.

Als Arbeitshypothese der durchgeführten Untersuchungen am Regenwurmintegument lässt sich bisher folgendes Modell hinsichtlich der Kaliumtransportmechanismen aufstellen (Abb. 38):



**Abbildung 38:** Modell der Kaliumtransportmechanismen der Epithelzellen der Regenwurmhaut. Ein apikaler Na/K/2Cl-Cotransporter nimmt neben Natrium und Chlorid auch Kalium in die Zelle auf. Eine Na/K-Pumpe in der basolateralen Membran nimmt Kalium aus dem Blut auf und gibt Natrium an dieses ab. Kalium kann die Zelle über Kaliumkanäle in der basolateralen Membran verlassen.

### 5.1.5 Selektivität des Gewebes für Natrium im Vergleich zu Kalium und anderen Alkalimetallen

In den vorherigen Kapiteln wurden mögliche Transportmechanismen des Epithels der Regenwurmhaut für Natrium und Kalium getrennt betrachtet. Im Folgenden soll zu einen darauf eingegangen werden, dass verschiedene Gewebe hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit zwischen Natrium und anderen Alkalimetallen unterscheiden (s.u.), und zum anderen darauf, dass die Alkalimetallkationen auch dieselben Ionentransportmechanismen benutzen können. Herrera hatte z.B. am Harnblasenepithel von Kröten gezeigt (Herrera, Egea et al. 1971; Herrera 1972), dass Lithium in der Lage war, dieses Epithel von apikal nach basolateral zu überwinden. Das Gewebe war dabei in der Lage zumindest vorübergehend einen Kurzschlussstrom sowie eine transpitheliale Potenzialdifferenz aufrecht zu erhalten. Beide Parameter konnten zum einen durch Ouabain sowie auch durch Amilorid beeinflusst werden. Das legte die Vermutung nahe, dass die beiden Alkalikationen Natrium und Lithium zumindest zum Teil die gleichen Transportmechanismen nutzen und zwar vermutlich den Epithelialen Natriumkanal sowie die Natrium/Kalium-Pumpe. Darauf basiert auch der Vorschlag, in der Medizin bei einer Lithiumintoxikation den Patienten einer forcierten Diurese mit dem Diuretikum Amilorid zu unterziehen (Czerniewski, Short et al. 1990). Das soll verhindern, dass Lithium von Epithelialen Natriumkanälen des Tubulussystems der Niere ständig rückresorbiert wird.

In den entsprechenden Versuchsreihen am Regenwurmintegument war aufgefallen, dass das Gewebe bei Substitution von Natrium in der apikalen Lösung durch keines der getesteten Alkalimetalle in der Lage war, einen Strom aufrechtzuerhalten, der mit dem Strom unter Natriumbedingungen vergleichbar war (vgl. Kap. 4.3.3.3). Die Ursache hierfür kann in einer Selektivität für Natrium in einem Ionentransportmechanismus der apikalen Membran (z.B. dem amiloridsensitiven Natriumkanal) oder der basolateralen Membran liegen (z.B. der Natrium/Kalium-Pumpe). In weniger dichten Geweben (sog. „leaky epithelia“) bestünde zusätzlich die Möglichkeit einer parazellulären Ionenverschiebung. Dieser Weg erscheint jedoch am ultradichten Epithel der Regenwurmhaut mit einem mittleren Gewebswiderstand von  $12 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  vernachlässigbar.

Für den Epithelialen Natriumkanal (ENaC) ist beschrieben, dass er durchweg eine Selektivität von Natrium  $>$  Kalium aufweist. Dabei bleibt die Tendenz gleich, egal welche Messmethode angewendet wird. Es ist im Allgemeinen auch nicht zu erwarten, dass ein Ionenkanal gleichermaßen für Natrium wie für Kalium permeabel ist, da davon auszugehen ist, dass  $\text{Na}^+$ -spezifische Regionen eine hohe Dichte an negativen Ladungen haben, sowie eine Geometrie, in die das Natriumion gerade hineinpasst. Dagegen sollten  $\text{K}^+$ -spezifische Regionen eine geringere Dichte an negativen Ladungen und eine Geometrie aufweisen, die für die Ausbildung sehr kurzer Bindungen zwischen Kation und koordinierten Gruppen weniger günstig ist (Stryer 1994).

In einer Zusammenfassung beschreibt Palmer (Palmer 1987) die Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich der Selektivität des ENaC von Natrium verglichen mit Kalium und

Lithium in unterschiedlichen Geweben (Tabellen 6 und 7). Beim Vorliegen von Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Messmethoden ermittelt wurden, ist aber zu bedenken, dass nicht alle Resultate direkt vergleichbar sind. Es macht einen Unterschied, ob an einem intakten Gewebe gemessen wurde (z.B. mit Hilfe der Ussingkammertechnik) oder an singulären Kanälen (wie z.B. bei der Patch-Clamp-Technik). Im Gewebe sind Epithelzellen polarisiert, was z.B. bei in Oocyten exprimierten Kanälen nicht der Fall ist. Hier ist außerdem zu beachten, dass die extrazellulären Schleifen nicht sekundär modifiziert werden. Dort, auf der Außenseite der Zellen, ist aber durchaus zumindest ein Teil des Selektivitätsfilters zu erwarten. Gerade der ENaC ist in vivo ein komplexes System und nicht nur eine Pore, die für Ionen alleine abhängig von Größe, Ladung und Gradient permeabel ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde am intakten Gewebe ermittelt, dass der überwiegende Teil des in den Substitutionsexperimenten gesunkenen Stroms den amiloridsensitiven Anteil des Gesamtstroms ausmachte. Das legte die Vermutung nahe, dass der amiloridsensitive Kanal die Selektivitätsbarriere darstellt. Es ist aber zu bedenken, dass die Natrium/Kalium-Pumpe den für einen Transport von Ionen über diesen Kanal notwendigen Gradienten aufrechterhält. Wenn die Ionenpumpe andere Alkalimetalle als Natrium nicht oder zumindest weniger gut als Substrat akzeptiert, dann wird automatisch auch der amiloridsensitive Strom kleiner. Auch ist zu bedenken, dass es zu einer Akkumulation von Ionen im Gewebe kommen kann, wenn diese auf der basolateralen Seite nicht eliminiert werden. Gerade Lithium und eventuell auch Rubidium und Cäsium können daraufhin intrazellulär toxisch wirken.

Mit den verwendeten Methoden kann also nicht unterschieden werden, ob der apikale Kanal oder die basolaterale Pumpe für den Effekt verantwortlich sind. Eine Möglichkeit zur Untersuchung dieser speziellen Fragestellung stellt die sogenannte Kaliumdepolarisation der basolateralen Membran dar. Dabei wird dem Gewebe auf der basolateralen Seite eine hohe Kaliumkonzentration angeboten und kein Natrium. Die Depolarisation der basolateralen Membran führt dazu, dass der Kaliumgradient über diese Membran zusammenbricht. Der Gradient stellt normalerweise eine Triebkraft für die apikale Aufnahme von Kationen dar (Chiba und Marcus 2001). Somit wird die basolaterale Membran irrelevant und es werden nur Transportvorgänge über die apikale Membran gemessen. Beim Regenwurm stellte sich diese Methode jedoch als nicht praktikabel heraus, da das Gewebe einerseits sehr lange brauchte, um einen steady-state zu erreichen, und andererseits nicht so lange aussagekräftige Messungen an dem Gewebe machbar waren. Auch eine Permeabilisierung der basolateralen Membran mit ionophoren Substanzen erwies sich als nicht umsetzbar, da auf der basolateralen Seite dem Epithel Muskelschichten anhaften und so die Endkonzentration der eingesetzten Substanz an der basolateralen Epithelseite sehr schlecht zu steuern war.

**Tabelle 6:** Selektivität des ENaCs gegenüber Kalium verglichen mit Natrium an verschiedenen Geweben (ergänzt nach Palmer 1987)

Gewebe	Na/K	Methode	Referenz
Krötenharnblase ( <i>Bufo marinus</i> )	500:1	amiloridsensitiver Strom	(Palmer 1982)
Froschhaut ( <i>Rana catesbeiana</i> )	>100:1	amiloridsensitiver Strom	(Benos, Mandel et al. 1980)
Blutegelhaut ( <i>Hirudo medicinalis</i> )	30:1	amiloridsensitiver Strom	(Blank 1994)
Regenwurmhaut ( <i>Lumbricus terrestris</i> )	25:1	amiloridsensitiver Strom	vorliegende Arbeit
A6-Zellen auf durchlässigem Filter	>20:1	Patch Clamp Technik	(Hamilton und Eaton 1985)
Froschhaut ( <i>Rana catesbeiana</i> )	20:1	Transepitheliale Spannungsänderungen	(Lindley und Hoshiko 1964)
Sammelrohr in der Rattenniere	>10:1	Einzelkanal-Umkehrpotenzial	(Palmer und Frindt 1986)
Kaninchenharnblase	2,6:1	Elektromotorische Kraft	(Lewis und Wills 1983)

In der Literatur sind viele Gewebe beschrieben, an denen Natrium hingegen problemlos durch Lithium ersetzbar ist und dennoch ein Strom aufrechterhalten werden kann (vgl. Tab.2). Bei den Anneliden kam man zu ganz anderen Ergebnissen. Eine apikale Applikation von Lithium führte zu einer starken Depression im  $I_{sc}$  und die relative Amiloridsensitivität von Lithium im Vergleich zu Natrium lag beim Blutegel bei ca. 20 % (Blank 1994) und beim Regenwurm sogar nur bei etwa 10 %. Das erscheint zunächst unlogisch, denn Lithiumionen sind kleiner als Natriumionen und eine Möglichkeit, warum ein Ionenkanal  $Na^+$  gegenüber anderen Alkalimetallkationen deutlich bevorzugt, liegt in dem kleinen Ionenradius des  $Na^+$  ( $r = 0,095 \text{ nm}$ ). Allerdings ist es energetisch sehr aufwendig,  $Na^+$  aus seiner Hydrathülle zu holen (freie Energie der Solvation  $301 \text{ kJ/mol}$ ), und  $Li^+$ -Ionen verfügen sogar über eine doppelte Hydrathülle.

Es lässt sich also bezüglich der Selektivität zusammenfassen, dass die Haut des Regenwurms insgesamt deutlich zwischen Natrium und anderen Alkalimetallen unterscheidet. Der Selektivitätsfilter liegt vermutlich im amiloridsensitiven Natriumkanal. Dabei können Ladungsverhältnisse an der Außenseite des Kanals, die Aufrechterhaltung der Triebkraft für das spezielle Ion und auch die Porengröße für eine unterschiedliche Permeabilität verantwortlich sein.

**Tabelle 7:** Selektivität des ENaCs gegenüber Lithium verglichen mit Natrium (ergänzt nach Palmer 1987)

Gewebe	Li/Na	Methode	Referenz
Krötenharnblase ( <i>Bufo marinus</i> )	1,3:1	Umkehrstrom unter $I_{sc}$ -Bedingungen	(Palmer 1982)
Froschhaut ( <i>Rana catesbeiana</i> )	1,1:1	Steady-state $I_{sc}$	(Benos, Mandel et al. 1980)
Schildkrötenkolon	~ 1:1	Steady-state $I_{sc}$	(Sarracino und Dawson 1979)
Blutegelhaut ( <i>Hirudo medicinalis</i> )	~0,2:1	amiloridsensitiver Strom	(Blank 1994)
Regenwurmhaut ( <i>Lumbricus terrestris</i> )	~0,1:1	amiloridsensitiver Strom	vorliegende Arbeit

**Tabelle 8:** Tabelle zum Selektivitätsprofil amiloridsensitiver Natriumkanäle modifiziert nach (Blank 1994)

Gewebe	Selektivitätsprofil	Referenz
Krötenblase ( <i>Bufo marinus</i> )	$H^+ > Li^+ > Na^+ \gg K^+$	(Palmer 1982)
Froschhaut ( <i>Rana catesbeiana</i> )	$Na^+ > Li^+ > Rb^+ > K^+ > Cs^+$	(Lindley und Hoshiko 1964)
Froschhaut ( <i>Rana catesbeiana</i> )	$Li^+ \approx Na^+ > Tl^+ > NH_4^+ \approx K^+ > Rb^+ > Cs^+$	(Benos, Mandel et al. 1980)
klonierter Ratten-ENaC	$Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$	(Ismailov, Shlyonsky et al. 1997)
Rattencolon	$Na^+ > Li^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$	(Garty und Benos 1988)
Blutegelhaut ( <i>Hirudo medicinalis</i> )	$Na^+ \gg Li^+ > NH_4^+ > K^+ \gg Cs^+ \approx Rb^+$	(Blank 1994)
Regenwurmhaut ( <i>Lumbricus terrestris</i> )	$Na^+ \gg Rb^+ \approx Li^+ \geq K^+ \approx Cs^+$	vorliegende Arbeit



### 5.1.6 Zusammenfassendes Modell der untersuchten Ionentransportmechanismen und Ausblick

Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lässt sich folgendes Modell der Ionentransportmechanismen über die Epithelzellen des Regenwurms *Lumbricus terrestris* formulieren:

In der apikalen Zellmembran ist neben einem amiloridsensitiven Natriumkanal (ENaC) auch ein furosemid- und bumetanidempfindlicher Natrium/Kalium/2-Chlorid-Cotransporter lokalisiert. Hinweise auf ein mögliches Vorkommen eines Natrium/Kalzium-Austauschers in der apikalen Membran ergaben sich lediglich aufgrund der höheren Potenz des Amilorid-Analogs Benzamil gegenüber der Muttersubstanz Amilorid. Es ist allerdings schwierig, das Vorkommen dieses Ionen-Antiporters mit physiologischen Methoden nachzuweisen, da bisher kein spezifischer Inhibitor beschrieben ist.

In der basolateralen Membran sorgt eine ouabainsensitive Natrium/Kalium-Pumpe für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten, der eine passive Aufnahme von Natrium über die apikale Membran ermöglicht. Gleichzeitig erlauben Kaliumkanäle eine passive Elimination von Kalium über die basolaterale Membran. Ein parazellulärer Transport von Elektrolyten ist bei diesem dichten Epithel nicht zu erwarten.

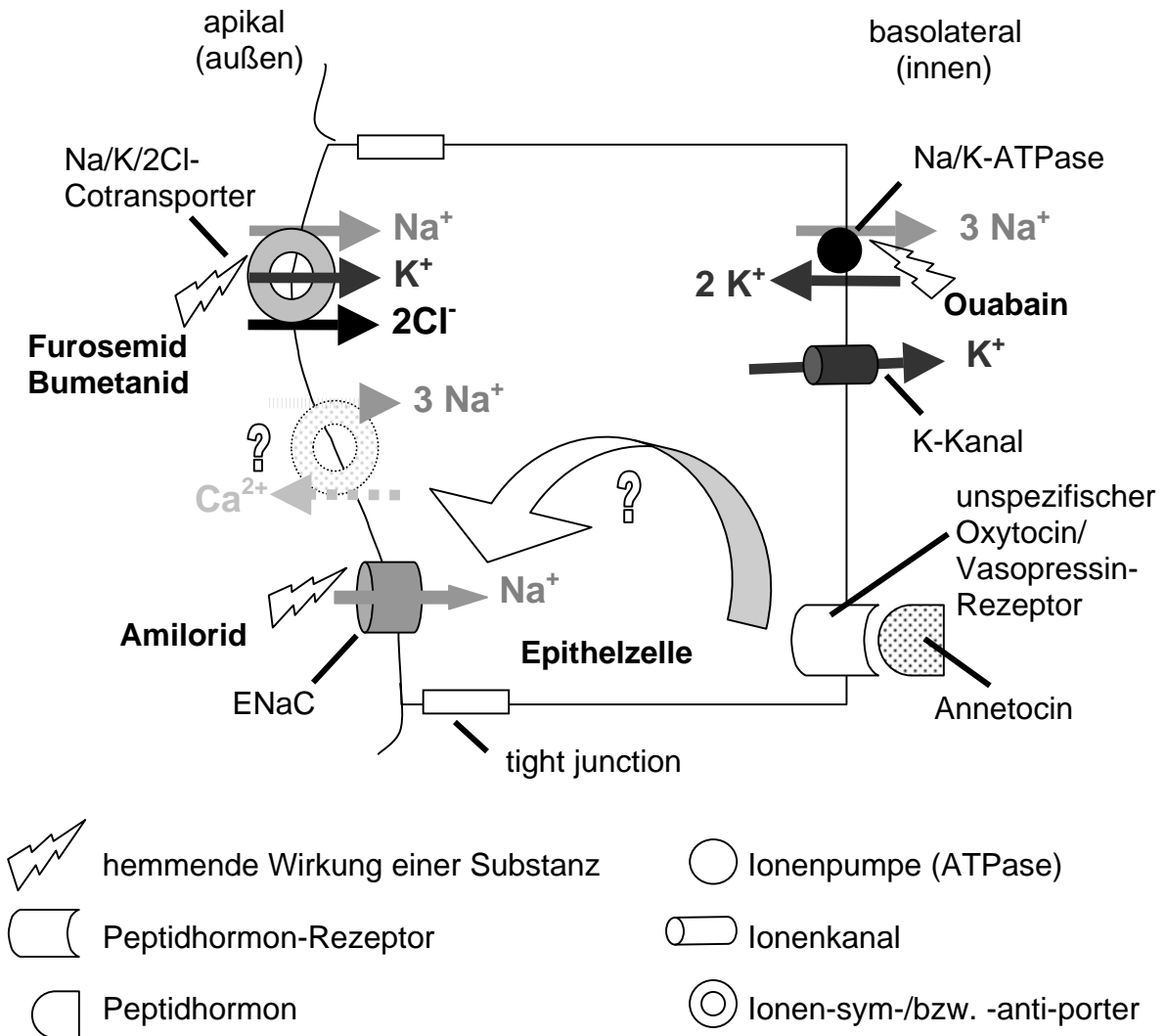
Die Funktion des ENaC wird beim Regenwurm zum einen durch die externe Natriumkonzentration beeinflusst, und zum anderen durch das endogene Peptidhormon Annetocin. Dabei verringern sowohl eine hohe externe Natriumkonzentration als auch die Ausschüttung des Peptidhormons ins Blut die Natriumaufnahme über den ENaC. Annetocin wirkt vermutlich über einen in der basolateralen Membran lokalisierten, membranständigen Rezeptor, der unspezifisch gegenüber verschiedenen Peptiden der Oxytocin/Vasopressin-Familie ist.

Nähere Untersuchungen zum second messenger-System dieses Peptidhormonrezeptors würden sich als nächster Arbeitsschritt anbieten. Dabei wäre es sinnvoll, zunächst die Wirkung von cAMP oder auch cGMP auf den  $I_{sc}$  zu untersuchen und in der Folge zu versuchen, einzelne Reaktionen bekannter Signaltransduktionskaskaden mit spezifischen Inhibitoren auszuschalten.

Des Weiteren bietet sich die Durchführung von Radioisotopen-Fluxuntersuchungen an, durch die z.B. eine Blockierung oder Stimulierung der Transportwege für einzelne Ionen verifiziert und quantifiziert werden könnte.

Hinsichtlich molekularbiologischer Arbeitsmethoden ist zu sagen, dass insgesamt bisher äußerst wenig über die Nukleotidsequenzen einzelner Gene des Regenwurms bekannt ist, und es daher noch einige Zeit dauern wird, bis ein struktureller Beweis für das Vorkommen der in dieser Arbeit funktionell beschriebenen Ionentransporter erbracht werden kann.

Auch immunhistochemische Untersuchungen hatten in der Vergangenheit nicht den gewünschten Erfolg erzielt, da es bisher keine homologen Antikörper gegen antigene Strukturen am Regenwurm gibt. Mit heterologen Antikörpern konnte in dieser Arbeit keine Bindung erreicht werden. Bezüglich des Detektionssystems für zukünftige Untersuchungen mit Hilfe von Antikörpern oder Nukleinsäuresonden sind Fluoreszenzfarbstoffe nach den bisherigen Erfahrungen nur bedingt zu empfehlen, da der Regenwurm bei einigen Anregungswellenlängen eine Autofluoreszenz aufweist.



**Abbildung 39:** Zusammenfassendes Modell der grundlegenden Ionentransport-mechanismen über das Integument von *Lumbricus terrestris*.

## 6 Zusammenfassung

Im Zuge der Untersuchung grundlegender Ionentransportmechanismen über die Haut des Regenwurms stellte sich das Epithel als sehr dicht (durchschnittlich 11.593 Ohm·cm<sup>2</sup>) und hochselektiv für die Aufnahme von Natrium gegenüber anderen Alkalimetallen heraus. Histologische Untersuchungen zeigten, dass die Haut des Regenwurms ein einschichtiges Epithel aufweist, welches sich aus mindestens drei verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Das Epithel wird nach außen durch eine kollagene Cuticula begrenzt. Auf der basolateralen Seite folgen Muskelschichten, die vom Epithel durch eine Basallamina getrennt sind.

Elektrophysiologische Messungen mit der Current-clamp Methode in modifizierten Ussingkammern zeigten, dass ein Teil des transepithelialen Stroms amiloridsensitiv war. Das deutete auf das Vorhandensein eines Epithelialen Natriumkanals (ENaC) in dem untersuchten Gewebe hin. Die halbmaximale Hemmkonzentration von  $k_{1/2} = 1,28 \pm 0,08 \mu\text{M}$  Amilorid lag deutlich unter der bei anderen Anneliden, wie dem limnisch lebenden Blutegel, gefundenen. Weitere Experimente mit amiloridanalogen Substanzen ergaben ein Sensitivitätsprofil von Benzamil > Phenamil > Amilorid > EIPA. Die Anneliden sind somit der niedrigste Tierstamm, in dem ein funktioneller ENaC beschrieben ist, während in niedrigeren Phyla (z.B. beim Nematoden *C. elegans*) nur eine strukturell ähnliche Vorstufe des Kanals in Form so genannter Degenerine bekannt ist.

Das macht das Gewebe interessant für die Grundlagenforschung zur epithelialen Natriumresorption, insbesondere da der Regenwurm ein natürlicher knock-out-Modellorganismus für das Steroidhormon Aldosteron ist. Peptidhormone hingegen kommen in diesem Tier vor, was eine schrittweise Erforschung des Effekts von Hormonen der Oxytocin/Vasopressin-Familie auf die Osmoregulation und speziell den ENaC ohne eine Überlagerung durch den Effekt von Steroidhormonen erlaubt. Eine solche Möglichkeit besteht in keinem Vertebratenmodell.

Experimente mit Oxytocin, Vasopressin, Vasotocin, Isotocin, Annetocin, 8-lys-Conopressin und einem neusynthetisierten Peptid (2-tyr-8-lys-Conopressin) auf den amiloridsensitiven Strom ( $I_{\text{amilo}}$ ) über die Regenwurmhaut ergaben, dass nur die Conopressinderivate den  $I_{\text{amilo}}$  steigerten, während alle anderen Peptidhormone diesen gesenkt hatten. Eine dabei aufgedeckte Dosisabhängigkeit des Oxytocineffekts auf  $I_{\text{amilo}}$  kann nun erklären, warum in der Literatur dieses Peptid von verschiedenen Autoren entweder als diuretisches oder auch als antidiuretisches Hormon beschrieben wird.

Andere Ionentransportmechanismen wie ein apikaler Na/K/2Cl-Cotransporter, eine basolaterale Na/K-ATPase und nach außen gerichtete Kaliumkanäle in der basolateralen Membran konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls funktionell beschrieben werden. Die Entwicklung eines detaillierten Modells von Ionenbewegungen über die Haut des Regenwurms soll in der Folge Experimente mit dem Regenwurm z.B. als Bioindikator für ökotoxikologische Fragestellungen ermöglichen.

## 7 Summary

In the course of the investigation of fundamental ion transport mechanisms across earthworm skin epithelium we revealed that this tissue is a very tight (11,593 Ohm·cm<sup>2</sup> in mean) and highly selective Na<sup>+</sup>-absorbing epithelium. Earthworm integument consists of a single layer of at least three different types of epithelial cells, covered by a collagenous cuticula and limited at its base by a basal-lamina, followed by muscle layers.

Performing Ussing-chamber experiments in current-clamp mode, we could show an amiloride-sensitive current which indicates an epithelial sodium channel (ENaC) in this tissue. The half maximum blocking concentration of amiloride ( $k_{1/2} = 1.28 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ) is considerably lower than in other annelids such as the limnic leech and further experiments with amiloride analogues showed an overall sensitivity profile of benzamil > phenamil > amiloride > EIPA. Annelids are therefore the lowest animal-strain shown to have this ion-channel, whereas in lower phyla (such as the nematode *C. elegans*) only a pre-stage of the ENaC in the form of a so called degenerin is described.

It makes the tissue an interesting model for fundamental research on epithelial sodium absorption, especially because earthworm skin is a natural aldosterone knock-out model, but peptide hormones are present in this phylum. This allowed a stepwise investigation of the effect of hormones belonging to the oxytocin-vasopressin superfamily on the osmoregulation and especially the ENaC without interference of steroid hormones, an approach which is not possible in vertebrate species.

The investigation of the effect of oxytocin, vasopressin, vasotocin, isotocin, annetocin, 8-lys-conopressin and a newly synthesized peptide (2-tyr-8-lys-conopressin) on the amiloride-sensitive short-circuit current ( $I_{\text{amilo}}$ ) across earthworm skin showed that only the conopressin-derivates led to an increase in  $I_{\text{amilo}}$  whereas all the other tested peptides led to a decrease. An also revealed dose-dependency of the hormone effect on  $I_{\text{amilo}}$  can explain why oxytocin is being described in the literature either as a natriuretic or an anti-natriuretic peptide by different authors.

Other ion transport systems like an apical Na/K/2Cl-cotransporter, a basolateral Na/K-ATPase and outward directed basolateral K<sup>+</sup>-channels could also be functionally described. The establishment of a detailed model of ion movements across earthworm skin will allow further experiments with the earthworm e.g. as a biomonitoring system for soil contaminations.

## 8 Literaturverzeichnis

- Almeida, A. J. und M. B. Burg (1982). "Sodium transport in the rabbit connecting tubule." Am J Physiol **243**(4): F330-4.
- Al-Yousuf, S. (1990). Neuropeptides in annelids. Progress in Comparative Endocrinology, Willey-Liss, Inc.: 232-41.
- Amasheh, S., H. J. Epple, et al. (2000). "Differential regulation of ENaC by aldosterone in rat early and late distal colon." Ann N Y Acad Sci **915**: 92-4.
- Anderson, D. T., Ed. (1998). Invertebrate Zoology, Oxford University Press.
- Benos, D. J., L. J. Mandel, et al. (1980). "Cationic selectivity and competition at the sodium entry site in frog skin." Journal of General Physiology **76**: 233-247.
- Bindslev, N., A. W. Cuthbert, et al. (1982). "Kinetics of amiloride action in the hen coprodaeum in vitro." Pflügers Arch **392**(4): 340-6.
- Blank, U. (1994). Beeinflussung des elektrogenen Natriumtransports am Integument von *Hirudo medicinalis* durch extrazelluläre Kationen. Institut für Tierphysiologie, Fachbereich Biologie. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Blank, U. (1996). Regulation des Ionentransports im menschlichen respiratorischen Epithel. Dissertation. Giessen.
- Böck, P., Ed. (1989). Mikroskopische Technik / Romeis. Neubearb. Wien, Urban & Schwarzenberg.
- Boroffka, I. (1965). "Elektrolyttransport im Nephridium von *Lumbricus terrestris*." Zeitschrift für vergleichende Physiologie **51**: 25-48.
- Boroffka, I. (1968). "Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis*." Zeitschrift für vergleichende Physiologie **57**: 348-375.
- Boucher, R. C. und J. T. Gatzky (1983). "Characteristics of sodium transport by excised rabbit trachea." J Appl Physiol **55**(6): 1877-83.
- Brater, D. C., C. P., et al. (1983). "Bumetanide and furosemide." Clin Pharmacol Ther **34**(2): 207-213.
- Burke, J. M. (1974). "An ultrastructural analysis of the cuticle, epidermis and esophageal epithelium of *eisenia foetida* (oligochaeta)." J. Morph. **142**: 301-320.
- Canessa, C. M., L. Schild, et al. (1994). "Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits." Nature **367**(6462): 463-7.
- Carley, W. W. (1975). "Effects of brain removal on integumental water permeability and ion content of the earthworm *lumbricus terrestris* l." Gen Comp Endocrinol **27**(4): 509-16.
- Carley, W. W. (1978). "Water economy of the earthworm *lumbricus terrestris* l.: coping with the terrestrial environment." J. Exp. Zool. **205**: 71-78.
- Carley, W. W. (1978b). "Neurosecretory control of integumental water exchange in the earthworm *Lumbricus terrestris* L." Gen Comp Endocrinol **35**(1): 46-51.
- Chiba, T. und D. C. Marcus (2001). "Basolateral K<sup>+</sup> conductance establishes driving force for cation absorption by outer sulcus epithelial cells." J Membr Biol **184**(2): 101-12.

- Chou, C. L., S. R. DiGiovanni, et al. (1995). "Oxytocin as an antidiuretic hormone. I. Concentration dependence of action." Am J Physiol **269**(1 Pt 2): F70-7.
- Claparède, E. (1862). "Histologische Untersuchungen über den Regenwurm (*Lumbricus terrestris* Linné)." Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie **19**: 563-624.
- Claprède, E. (1862). "Histologische Untersuchungen über den Regenwurm (*Lumbricus terrestris* Linné)." Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie **19**: 563-624.
- Clauss, W. (2001). "Epithelial transport and osmoregulation in annelids." Can. J. Zool. **79**: 192-203.
- Clauss, W., J. E. Dürr, et al. (1987). "Effects of adrenal steroids on Na transport in the lower intestine (coprodeum) of the hen." J Membr Biol **96**(2): 141-52.
- Clauss, W. G. (1989). "Hormonelle Regulation des Ionentransports." Verh. Dtsch. Zool. Ges. **82**: 27-44.
- Coggeshall, R. E. (1966). "A fine structural analysis of the epidermis of the earthworm, *lumbricus terrestris* l." The Journal of Cell Biology **28**: 95-108.
- Cornell, J. C. (1979). "Sodium and chloride transport in the isolated intestine of *lumbricus terrestris*." Am. Zool. **19**: 945.
- Cornell, J. C. (1982). "Sodium and chloride transport in the isolated intestine of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (L.)." J Exp Biol **97**: 197-216.
- Cragoe, E. J. J., T. R. Kleyman, et al., Eds. (1992). Amiloride and its analogs - Unique cation transport inhibitors. New York, VHC Publishers, Inc.
- Czerniewski, I. W. D., J. A. Short, et al. (1990). "Saline infusion and amiloride in the managment of lithium toxicity." West of England Medical Journal **105**(iii): 85-86.
- Darboux, I., E. Lingueglia, et al. (1998). "A new member of the amiloride-sensitive sodium channel family in *drosophila melanogaster* peripheral nervous system." Biochem Biophys Res Commun **246**(1): 210-6.
- de With, N. D., J. W. Slootstra, et al. (1988). "The bioelectrical activity of the body wall of the pulmonate freshwater snail *lymnaea stagnalis*: effects of neurotransmitters and the sodium influx stimulating neuropeptides." Gen Comp Endocrinol **70**(2): 216-223.
- Diener, M. (2003). mündliche Mitteilung.
- Dietz, T. H. (1974). "Active chloride transport across the skin of the earthworm, *lumbricus terrestris* l." Comparative Biochemistry and Physiology **49**(A): 251-258.
- Dietz, T. H. und R. H. Alvarado (1970). "Osmotic and ionic regulation in *lumbricus terrestris* L." Biol Bull **138**: 247-261.
- Dorresteyn, A. (2004). mündliche Mitteilung. Giessen.
- Durchon, M. (1967). L'endocrinologie des vers et des mollusques. Paris, Masson et Cie.
- Feldmann, G. M. und K. Drewnowska (1992). K<sup>+</sup>-sparing diuretics. Amiloride and its analogs - Unique cation transport inhibitors. E. J. J. Cragoe, T. R. Kleyman and L. Simchowicz. New York, VHC Publishers, Inc.
- Fewou, J. und N. Dhainaut-Courtois (1995). "Research on polychaete annelid osmoregulatory peptide(s) by immunocytochemical and physiological approaches. Computer reconstruction of the brain and evidence for a role of angiotensin-like molecules in *nereis* (*hediste*) *diversicolor* OF Müller." Biol Cell **85**: 21-33.

- Fischer, E., A. Toth, et al. (2001). "Deltamethrin, effects on volume control, and water balance in *eisenia fetida* sav. (annelida, lumbricidae)." Bull Environ Contam Toxicol **66**(2): 269-76.
- Fischer, H., W. Van Driessche, et al. (1989). "Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells." Am J Physiol **256**(4 Pt 1): C764-71.
- Frindt, G., H. Sackin, et al. (1990). "Whole-cell currents in rat cortical collecting tubule: low-Na diet increases amiloride-sensitive conductance." Am J Physiol **258**(3 Pt 2): F562-7.
- Fronius, M., A. Berk, et al. (2004). "Ion transport across xenopus alveolar epithelium is regulated by extracellular ATP, UTP and adenosine." Respir Physiol Neurobiol **139**(2): 133-44.
- Fujino, Y., T. Nagahama, et al. (1999). "Possible functions of oxytocin/vasopressin-superfamily peptides in annelids with special reference to reproduction and osmoregulation." J Exp Zool **284**(4): 401-6.
- Garty, H. und D. J. Benos (1988). "Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channel." Physiol Rev **68**(2): 309-73.
- Garvin (1985). "Phenamil: an irreversible inhibitor of sodium channels in the toad urinary bladder." J Membr Biol **87**: 45.
- Gimpl, G. und F. Fahrenholz (2001). "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation." Physiol Rev **81**(2): 629-83.
- Grassé, P.-P., Ed. (1959). Traité de Zoologie. Paris, Masson et C<sup>ie</sup> Éditeurs.
- Hamilton, K. L. und D. C. Eaton (1985). "Single-channel recordings from amiloride-sensitive epithelial sodium channel." American Journal of Physiology **249**: C200-C207.
- Herrera, F. C. (1972). "Inhibition of lithium transport across toad bladder by amiloride." American Journal of Physiology **222**(2): 499-502.
- Herrera, F. C., R. Egea, et al. (1971). "Movement of lithium across toad urinary bladder." American Journal of Physiology **220**(5): 1501-1508.
- Hierholzer, K. und D. Neubert (1977). Endokrinologie I. München, Urban & Schwarzenberg.
- Highnam, K. C. und L. Hill (1969). The comparative endocrinology of the invertebrates. London, Edward Arnold Publishers Ltd.
- Hildebrandt, J. P. und I. Zerbst-Boroffka (1992). "Osmotic and ionic regulation during hypoxia in the medicinal leech, *hirudo medicinalis* L." J Exp Zool **263**(4): 374-81.
- Huang, W., S. L. Lee, et al. (1996). "Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin." Am J Physiol **270**(2 Pt 2): R427-33.
- Huang, W., S. L. Lee, et al. (1995). "Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl." Am J Physiol **268**(3 Pt 2): R634-40.
- Ismailov, I. I., V. G. Shlyonsky, et al. (1997). "Cation permeability of a cloned rat epithelial amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel." Journal of Physiology **504**(2): 287-300.

- Kaczorowski, G. J. (1992).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchange. Amiloride and its analogs - unique cation transport inhibitors. E. J. J. Cragoe, T. R. Kleyman and L. Simchowicz. New York, VCH Publishers, Inc.: 121-144.
- Kamemoto, F. I. (1964). "The influence of the brain on osmotic and ionic regulation in earthworms." General and Comparative Endocrinology **4**: 420-426.
- Kamemoto, F. I., S. A. E., et al. (1962). "Ionic balance in blood and coelomic fluid of earthworms." Biol Bull **22**: 228-231.
- Kellenberger, S. und L. Schild (2002). "Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure." Physiol Rev **82**(3): 735-67.
- Koefoed-Johnson, V. und H. H. Ussing (1958). "The nature of the frog skin potential." Acta Physiol Scand **42**: 298-308.
- Krattenmacher, R. und W. Clauss (1988). "Electrophysiological analysis of sodium-transport in the colon of the frog (*Rana esculenta*). Modulation of apical membrane properties by antidiuretic hormone." Pflügers Arch **411**(6): 606-12.
- Krumm, S. (2002). Ionentransport über das Epithel des Regenwurminteguments am Beispiel von *Lumbricus terrestris*. Institut für Tierphysiologie, Fachbereich Biologie. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Lewis, S. A. und N. K. Wills (1983). "Apical membrane permeability and kinetic properties of the sodium pump in rabbit urinary bladder." J. Physiol. **341**: 161-184.
- Lindley, B. D. und T. Hoshiko (1964). "The effects of alkali metal cations and common anions on the frog skin potential." The Journal of General Physiology **47**: 749-771.
- Lingueglia, E., S. Renard, et al. (1993). "Molecular cloning and functional expression of different molecular forms of rat amiloride-binding proteins." Eur J Biochem **216**(2): 679-87.
- Lingueglia, E., N. Voilley, et al. (1993). "Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel. A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins." FEBS Lett **318**(1): 95-9.
- Lyness, J., A. G. Robinson, et al. (1985). "Antidiuretic effects of oxytocin in the brattleboro rat." Experientia **41**(11): 1444-6.
- Lyon, H. (1994). Mayer's hematoxylin-eosin: an example of a common histological staining method. Cell Biology - a laboratory handbook. J. E. Celis. London, Academic Press Inc. **2**.
- Maluf, N. S. R. (1939). "The volume and osmo-regulative functions of the alimentary tract of the earthworm (*L. terrestris*) and on the absorption of chloride from fresh water by this animal." Zool Jb **59**: 533-552.
- Milde, H., W. G. Clauss, et al. (1996). "Modulation of  $\text{Na}^+$  transport across leech skin by pesticides and heavy metals." Exp. Biol. Online **1**: 8.
- Milde, H., W. M. Weber, et al. (2001). "Regulation of  $\text{Na}^+$  transport across leech skin by peptide hormones and neurotransmitters." J Exp Biol **204**(Pt 8): 1509-17.
- Mizuno, J. und N. Takeda (1988). "Phylogenetic study of the oxytocin-like immunoreactive system in invertebrates." Comp Biochem Physiol A **91**(4): 733-8.



- Mizuno, J. und N. Takeda (1988a). "Phylogenetic study of the arginine-vasotocin/arginine-vasopressin-like immunoreactive system in invertebrates." Comp Biochem Physiol A **91**(4): 739-47.
- Nieczaj, R. und I. Zerbst-Boroffka (1993). "Hyperosmotic acclimation in the leech, *hirudo medicinalis* l.: energy metabolism, osmotic, ionic and volume regulation." Comp Biochem Physiol Comp Physiol **106**(4): 595-602.
- Oglesby, L. C. (1978). Salt and water balance. Physiology of annelids. P. J. Mill. London, Academic Press.
- Oumi, T., K. Ukena, et al. (1994). "Annetocin: an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *eisenia foetida*." Biochem Biophys Res Commun **198**(1): 393-9.
- Oumi, T., K. Ukena, et al. (1996). "Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *eisenia foetida*." J Exp Zool **276**(2): 151-6.
- Palmer, L. G. (1982). "Ion selectivity of the apical membrane Na channel in the toad urinary bladder." The Journal of Membrane Biology **67**: 91-98.
- Palmer, L. G. (1987). "Ion selectivity of epithelial Na channels." The Journal of Membrane Biology **96**(2): 97-106.
- Palmer, L. G., I. S. Edelman, et al. (1980). "Current-voltage analysis of apical sodium transport in toad urinary bladder: effects of inhibitors of transport and metabolism." J Membr Biol **57**(1): 59-71.
- Palmer, L. G. und G. Frindt (1986). "Amiloride-sensitive sodium channels from the apical membrane of the rat cortical collecting tubule." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 2767-2770.
- Palmer, L. G., H. Sackin, et al. (1998). "Regulation of Na<sup>+</sup> channels by luminal Na<sup>+</sup> in rat cortical collecting tubule." J Physiol **509** ( Pt 1): 151-62.
- Perrier, E. (1874). "Études sur l'organisation des lombriciens terrestres." Arch. Zool. exp. gén. **3**: 331-530.
- Prusch, R. D. und T. Otter (1977). "Annelid transepithelial ion transport." Comparative Biochemistry and Physiology **57A**: 87-92.
- Quinton, P. M. (1981). "Effects of some ion transport inhibitors on secretion and reabsorption in intact and perfused single human sweat glands." Pflügers Arch **391**(4): 309-13.
- Ribeiro, R., B. Heinke, et al. (2001). "Cell volume-induced changes in K<sup>+</sup> transport across the rat colon." Acta Physiol Scand **171**(4): 445-458.
- Richards, S. K. (1974). "The ultrastructure of the cuticle of some british lumbricids (annelida)." J. Zool. **172**: 303-316.
- Richards, S. K. (1978). Epidermis and cuticle. Physiology of annelids. P. Mill. London, Academic Press.
- Richards, S. K. und C. Arme (1979). "Transintegumentary uptake of amino acids by the lumbricid earthworm *eisenia foetida*." Comparative Biochemistry and Physiology **64**(A): 351-356.
- Romeis, B. (1948). Mikroskopische Technik. München, Leibniz Verlag.

- Roots, B. I. (1956). "The water relations of earthworms: II. Resistance to desiccation and immersion, and behaviour when submerged and when allowed a choice of environment." Quaterly Rev. Biophys. **33**: 29-44.
- Salzet, M., P. Bulet, et al. (1993). "Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech erpobdella octoculata." Eur J Biochem **217**(3): 897-903.
- Salzet, M., P. Bulet, et al. (1994). "FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance." Eur J Biochem **221**(1): 269-75.
- Salzet, M., P. Bulet, et al. (1995). "Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech erpobdella octoculata. Angiotensin II Amide." J Biol Chem **270**(4): 1575-82.
- Salzet, M., P. Bulet, et al. (1996). "Structural characterization of a novel neuropeptide from the central nervous system of the leech erpobdella octoculata. The leech osmoregulator factor." J Biol Chem **271**(12): 7237-43.
- Salzet, M., C. Watzet, et al. (1993). "Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *theromyzon tessulatum*." Brain Res **631**(2): 247-55.
- Sarracino, S. M. und D. C. Dawson (1979). "Cation selectivity in active transport: properties of the turtle colon in the presence of mucosal lithium." The Journal of Membrane Biology **46**: 295-313.
- Satake, H., K. Takuwa, et al. (1999). "Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in annelida." J Biol Chem **274**(9): 5605-11.
- Saunders, W. G. und R. A. Munsick (1966). "Antidiuretic potency of oxytocin in women post partum." Am J Obstet Gynecol **95**(1): 5-11.
- Schafer, J. A. (2002). "Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **283**(2): F221-35.
- Schnizler, M. und W. Clauss (1998). "Characterization of a voltage-dependent conductance in the basolateral membrane of leech skin epithelium." J Comp Physiol [B] **168**(4): 295-302.
- Schnizler, M. und W. Clauss (2003). "Gd<sup>3+</sup>-sensitive Na<sup>+</sup> transport across the integument of *hirudo medicinalis*." Physiol Biochem Zool **76**(1): 115-21.
- Schnizler, M. K., S. Krumm, et al. (2002). "Annelid epithelia as models for electrogenic Na transport." Biochimica et Biophysica Acta **1566**: 84-91.
- Shaohu, S., J. Li, et al. (2000). "Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel." The Journal of Biological Chemistry **275**(12): 8572-8581.
- Simchowicz, L., T. R. Kleyman, et al. (1992). An overview of the structure-activity relations in the amiloride-series. Amiloride and its analogs - Unique cation transport inhibitors. E. J. J. Cragoe, T. Kleymann, R. and L. Simchowicz. New York, VHC Publishers, Inc.
- Sjoquist, M., W. Huang, et al. (1995). "Natriuretic role of oxytocin in sodium homeostasis in rats." Adv Exp Med Biol **395**: 353-4.

- Smith, R. I. (1970). "Chloride regulation at low salinities by nereis diversicolor (annelida, polychaeta). I. Uptake and exchanges of chloride." J Exp Biol **53**(1): 75-92.
- Smith, R. I. (1970a). "Chloride regulation at low salinities by Nereis diversicolor (Annelida, Polychaeta). II. Water fluxes and apparent permeability to water." J Exp Biol **53**(1): 93-100.
- Smith, R. I. (1976). "Exchanges of sodium and chloride at low salinities by nereis diversicolor (annelida, polychaeta)." Biol Bull **151**(3): 587-600.
- Stanton, B. A. (1989). "Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **256**(5 Pt 2): F862-8.
- Stryer, L. (1994). Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akad. Verlag.
- Sylvia, A. L. und E. G. Boettiger (1967). "Transmembrane potential and short-circuit current studies in the anterior intestine of the earthworm." Life Sciences **6**: 2199-2205.
- Takahama, H., K. Haibara, et al. (1998). "Immunohistochemical localization of annetocin, an earthworm oxytocin-related peptide, and identification and ultrastructural characteristics of th annetocin-secretoy cells in the oligochaete earthworm eisenia foetida." Zoological Science **15**: 381-388.
- Takahashi, T., M. Kawashima, et al. (1995). "Diuretic and antidiuretic effects of mesotocin as compared with the antidiuretic effect of arginine vasotocin in the hen." Poult Sci **74**(5): 890-2.
- Tercafs, R. R. (1965). "Phénomènes de perméabilité au niveau de la peau de lumbricus terrestris l. (oligochaeta). Variations des caractères de perméabilité en fonction des concentrations ioniques." Acta Physiologica Latino Americana **15**: 206-214.
- Ukena, K., T. Oumi, et al. (1995). "Effects of annetocin, an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm eisenia foetida, and some putative neurotransmitters on gut motility of the earthworm." J Exp Zool **272**(3): 184-93.
- Ussing, H. H. und K. Zerahn (1951). "Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin." Acta Physiol Scand **23**: 110-127.
- Van Driessche, W. und B. Lindemann (1979). "Concentration dependence of currents through single sodium-selective pores in frog skin." Nature **282**(5738): 519-20.
- van Kesteren, R. E., C. P. Tensen, et al. (1996). "Co-evolution of ligand-receptor pairs in the vasopressin/oxytocin superfamily of bioactive peptides." J Biol Chem **271**(7): 3619-26.
- Walter, R., J. Rudinger, et al. (1967). "Chemistry and structure-activity relations of the antidiuretic hormones." Am J Med **42**(5): 653-77.
- Weber, W. M., U. Blank, et al. (1995). "Regulation of electrogenic Na(+) transport across leech skin." The American Physiology Society: R605-R613.
- Weber, W. M., B. Dannenmaier, et al. (1993). "Ion transport across leech integument." J Comp Physiol [B] **163**: 153-159.
- Wehner, R. und W. Gehring (1995). Zoologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Wenning, A. (1986). "Nervous control of salt and water balance in the leech, hirudo medicinalis l." Zool. Beitr. **30**: 379-392.

- Wenning, A. (1996). "Managing high salt loads: from neuron to urine in the leech." Physiological Zoology **69**(4): 719-745.
- Westheide, W. und R. Rieger (1996). Spezielle Zoologie - Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Young, O. S. und D. J. Benos (1992). Amiloride-sensitive sodium channels. Amiloride and its analogs - Unique cation transport inhibitors. E. J. J. Cragoe, T. R. Kleyman and L. Simchowitz. New York, VHC Publishers, Inc.
- Zeiske, W., H. Onken, et al. (1992). "Invertebrate epithelial Na<sup>+</sup> channels: amiloride-induced current-noise in crab gill." Biochim Biophys Acta **1105**(2): 245-52.
- Zerbst-Boroffka, I. (1975). "Function and ultrastructure of the nephridium in *hirudo medicinalis* L." J Comp Physiol **100**: 307-315.
- Zerbst-Boroffka, I. (1975). "Morphology and function of the metanephridia in annelids." Fortschr. Zool. **23**: 33-47.
- Zerbst-Boroffka, I. (1984). Homeostatic function of integuments and nephridia in annelids. Osmoregulation in estuarine and marine animals. Taormina, Springer-Verlag.
- Zerbst-Boroffka, I. (1987). "Ion transport mechanism in basal and diuretic nephridia of the leech, *hirudo medicinalis* L." Comp Biochem Physiol **86A**(1): 151-154.
- Zerbst-Boroffka, I., B. Bazin, et al. (1986). "Hormonale und pharmakologische Beeinflussung der Nephridienfunktion beim Blutegel, *Hirudo medicinalis* L." Verh. Dtsch. Zool. Ges. **79**: 352-353.
- Zerbst-Boroffka, I., B. Bazin, et al. (1997). "Chloride secretion drives urine formation in leech nephridia." J Exp Biol **200**: 2217-2227.
- Zerbst-Boroffka, I. und A. Wenning (1986). "Mechanisms of regulatory salt and water excretion in the leech, *hirudo medicinalis* L." Zool. Beitr. **30**: 359-377.
- Zerbst-Boroffka, I., A. Wenning, et al. (1982). "Primary urine formation during diuresis in the leech, *hirudo medicinalis* L." J Comp Physiol **146**: 75-79.
- Zerbst-Boroffka, I., A. Wenning, et al. (1983). "Antidiuretischer Faktor beim Blutegel, *Hirudo medicinalis*." Verh. Dtsch. Zool. Ges. **242**: 243.
- Zimmermann, P. (1971). "Die zentralnervöse Kontrolle der Dehydration bei *Lumbricus terrestris* L." Z Zellforsch **112**: 551-571.
- Zimmermann, P. (1973). "Zur neuronalen Regulation des Wasserhaushalts bei *Lumbricus terrestris* L." Z Zellforsch **145**: 103-118.

## 9 Anhang

### 9.1 verwendete Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

<b>digitale Kamera</b>	Olympus Camedia C-3030 Zoom
<b>Gefriermicrotom</b>	Microm HM 500 OM und Frigocut 2800, beides Fa. Microm (über Laborservice Brenzinger)
<b>Glaswaren</b>	Fa. Roth, Karlsruhe
<b>Kameraadapter</b>	Olympus C-3030 ADL
<b>Laser</b>	Laser-Konfokal-System Typ MRC 1024, Fa. BioRad, U.K. Krypton-Ionen-Laser Typ ENT R 622, Fa.Coherent Laser Group, USA
<b>Lichtmikroskope</b>	Axiovert 135 M, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen sowie Olympus BH 2
<b>Mikroskopobjektive</b>	Fluar 40 x NA 1,30 sowie Plan NeoFluor 63 x NA 1,25
<b>Objektträger</b>	Menzel, Superfrost Plus® (über Fa. A. Hartenstein)
<b>Petrischalen</b>	Fa. Greiner, Frickenhausen
<b>pH-Meter</b>	Knick, Berlin, Typ pH 27 (über Fa. Kretschmer, Gießen)
<b>Pipetten</b>	Fa. Abimed, Langenfeld, pipetman P1000 und P20
<b>Pipettenspitzen</b>	Roth 2679.1 (blau) und 2395.1 (gelb)
<b>Szintillationsgefäße</b>	Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt, MINIS®2001, Art.-Nr. 3020001
<b>Szintillationszähler</b>	Tri-carb 2700TR Liquid Scintillation Analyzer
<b>Waagen</b>	Mettler H54; Mettler P163; Sartorius U3600
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Christ, Laborfuge A, Typ 2500

### 9.2 verwendete Computer und Anwendungsprogramme

#### Konfokale Laser Scanning Mikroskopie:

PC	Compaq prosignia 300
Betriebssystem	OS 2
Anwendung	LaserSharp Programm 3.1, Fa. BioRad, U.K.

**Elektrophysiologische Messungen in der Ussingkammer:**

Voltage-Clamp-Amplifier	Prof. Dr. W. Nagel, Institut für Physiologie, Universität München
A/D-Wandler	MacLab, Fa. Analog Digital Instruments, Castle Hill, Australien, umgebaut für die Anwendung am PC durch Prof. Dr. W. Nagel
PCs	Genuine Intel Pentium
Betriebssysteme	Windows 95 bzw. 98, Fa. Microsoft, USA
Anwendung	Chart Version 4.0.2, Fa. Analog Digital Instruments, Castle Hill, Australien

**weitere Bearbeitung aller Daten:**

PC	Gericom Intel® Pentium® 4 CPU 1,80GHz, Fa. Gericom
Betriebssystem	Windows XP home, Fa. Microsoft, USA
Anwendungen	Adobe Photoshop 5.5, Fa. Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim ISIS <sup>TM</sup> /Draw 2.4, Fa. MDL Information Systems Inc, USA Microcal Origin 5.0 bzw. 6.1 Professional, Fa. OriginLab Corporation, Northhamptom, U.K. Office 2003 für Windows, Fa. Microsoft, USA Confocal Assistant 4.02, © Todd Clark Brelje

**9.3 verwendete Chemikalien**

<b>Agar</b>	Sigma A-7002
<b>Amilorid</b>	N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrzinocarboxamide, Sigma A-7410
<b>Annetocin</b>	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Osama Matsushima, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Hiroshima, Japan
<b>Arg-Vasopressin</b>	Arginin-Vasopressin, Sigma V-9879
<b>Arg-Vasotocin</b>	Arginin-Vasotocin, Sigma V-0130
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	Bariumchlorid, Riedel-de Haën 31125
<b>Benzamil</b>	N-(Benzylamidino)-3,5-diamino-6-Chloropyrazin-Carboxamid, Sigma B-2417
<b>Bumetanid</b>	3-(Aminosulfonyl)-5-(butylamino)-4-phenoxybenzoic acid, Sigma B-3023

<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalziumchlorid, Merck 2380
<b>CsCl</b>	Cäsiumchlorid, Sigma C-3011
<b>DMSO</b>	Diethylsulfoxid, Sigma D-5879
<b>EIPA</b>	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid, Sigma A-3085
<b>Ethanol</b>	Rotipuran®, Roth 9065.1
<b>Furosemid</b>	(5-[Aminosulfonyl]-4-chloro-2-[2-furanylmethyl]aminobenzoic acid, Sigma F-4381
<b>H33342</b>	Farbstoff, Hoechst
<b>HEPES</b>	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulonic acid], Fluka 54461
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Salpetersäure
<b>Isopentan</b>	2-Methylbutan, Aldrich 27,034-2
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid, Fluka 60130
<b>LiCl</b>	Lithiumchlorid, Merck 5679
<b>Lys-Conopressin</b>	Sigma C-1807
<b>Lys-Vasopressin</b>	Sigma V-6879
<b>Mowiol</b>	Mountingmedium, Hoechst
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid, Fluka 71379
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat, Merck 6329
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat, Fluka 71645
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Natriumdihydrogenphosphat, Fluka 71500
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>Ouabain</b>	G-Strophantin, 1β,3β,5β,11α,14,19-Hexahydroxycard-22[22]enolide 3-[6-deoxy-α-L-Mannopyranoside], Sigma O-3215
<b>Oxytocin</b>	Sigma O-4375
<b>Paraformaldehyd</b>	Merck 818715
<b>Phalloidin-FITC</b>	Sigma P-5282
<b>Phenamil</b>	3,5-Diamino-6-Chloro-N-[Imino(Phenyl-amino)Methyl]-Pyrazin-Carboxamid, Sigma P-203
<b>Quinine</b>	Chinin, Sigma Q-1878
<b><sup>86</sup>Rb</b>	PerkinElmer Life Sciences, Inc. Boston, MA, 02118 USA
<b>RbCl</b>	Rubidiumchlorid, Aldrich 21,527-9
<b>Saccharose</b>	Sucrose, Fluka 84100

<b>Silberdraht</b>	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland, AG 25 W
<b>Szintillationsflüssigkeit</b>	rotiszint®ecoplus, Fa. Roth, Art-Nr. 0016.2
<b>Tissue-Tec®</b>	Gewebeeinbettmittel, Miles, USA
<b>TMA-Cl</b>	Tetramethylammoniumchlorid, Fluka 87718
<b>Tocinoic acid</b>	Sigma T-3149
<b>Triton® X</b>	Roth 3051.2
<b>2-Tyr-8-Lys-Conopressin</b>	synthetisiert von Advanced ChemTech, Giessen, Deutschland

## 9.4 Bezugsquellen

Firmenname	Postadresse	Telefon-nummer	URL homepage
Abimed	Postfach 1111 D-40736 Langenfeld	Tel.: +49 2173 89050	<a href="http://www.abimed.de">http://www.abimed.de</a>
Advanced ChemTech Europe	Asterweg 39 D-35390 Giessen	Tel.: +49 641 9312350	<a href="http://triton.peptide.com">http://triton.peptide.com</a>
A. Hartenstein	Estenfelder Str. 74 D-97078 Würzburg	Tel.: +49 931 24522	<a href="http://www.laborversand.de">http://www.laborversand.de</a>
Aldrich	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	Tel: +49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
BioRad	Maylands Avenue Hemel Hempstead Herts HP2 7TD	+44 20 83282555	<a href="http://www.bio-rad.com">http://www.bio-rad.com</a>
Carl Zeiss	Carl-Zeiss-Str. 22 D-73447 Oberkochen	Tel.: +49 7364 200	<a href="http://www.zeiss.de">http://www.zeiss.de</a>
Coherent Inc. Laser Group	5100 Patrick Henry Drive, Santa Clara, CA 95054, USA	Tel.: +001 408 764 4000	<a href="http://www.coherentinc.com">http://www.coherentinc.com</a>
Fluka	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	Tel: +49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>



Greiner GmbH	Maybachstr. 2 D-72636 Frickenhausen	Tel.: +49 7022 9480	<a href="http://www.greiner-lab.com">http://www.greiner-lab.com</a>
Heraeus Holding GmbH	Heraeusstr. 12-14 D-63450 Hanau	Tel.: +49 6181 350	<a href="http://www.heraeus.de">http://www.heraeus.de</a>
Kretschmer	Am unteren Rain 3 D-35394 Gießen	Tel.: +49 641 72365	
Laborservice Brenzinger (Microm)	Schulstr.8 D-69190 Walldorf	Tel.: +49 6227 61610	
Martin Langhoff	Felix-Wankel-Str.8 D-52351 Düren	Tel.: +49 02421 2085955	<a href="http://www.superwurm.de">http://www.superwurm.de</a>
Prof. Dr. Osama Matsushima	Department of Biological Science Faculty of Science Hiroshima University Kagamiyama 1-3-1 Higashi-Hiroshima 739-8526 Japan	Tel.: +81 824 22 7111	e-mail: <a href="mailto:matsu88@cc.it-hiroshima.ac.jp">matsu88@cc.it-hiroshima.ac.jp</a>
Merck Biosciences GmbH	Ober der Röth 4 D-65824 Schwalbach	Tel.: +49 6196 63955	<a href="http://www.merckbiosciences.de">http://www.merckbiosciences.de</a>
Prof. Dr. Wolfram Nagel	Institut für Physiologie Universität München D-80336 München	Tel.: +49 89 5996518	e-mail: <a href="mailto:W.Nagel@lrz.uni-muenchen.de">W.Nagel@lrz.uni-muenchen.de</a>
Olympus	Wendenstr. 14-18 D-20097 Hamburg	Tel.: +49 40 23773728	<a href="http://www.olympus.de">http://www.olympus.de</a>
PerkinElmer	45 William Street Wellesley, Ma 03481-4078, USA	Tel.: +001 781 2375100	<a href="http://www.perkinelmer.com">http://www.perkinelmer.com</a>
Riedel-de Haën	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	Tel: +49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>

Roth	Schoemperlenstr. 1-5 D-76185 Karlsruhe	Tel: +49 721 56060	<a href="http://www.Carl-Roth.de">http://www.Carl-Roth.de</a>
Sigma	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	Tel: +49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Zinsser Analytic GmbH	Eschborner Landstr. 135 D-60489 Frankfurt/M.	Tel.: +49 69 7891060	<a href="http://www.zinsser-analytic.com">http://www.zinsser-analytic.com</a>

## 9.5 Rezepte für die Histologischen Färbungen

(aus dem Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Straße 96, D-35392 Gießen, Tel.: +49 641 9938200)

### Elastica v. Gieson

1. Entparaffinieren bis 80% Alkohol
2. 10 min 5 % Ammoniaklösung (Kardasewitsch)
3. gründlich wässern
4. 45-60 min Resorcinfuchsin im Brutschrank, vorher filtrieren
5. Wässern mit aqua dest.
6. 5 min Kernfärbung mit Eisenhämatoxilin (4 Teile A, 3 Teile B)
7. 10 min Wässern
8. 5-7 min Pikrinsäure-Thiazinrot
9. Spülen in aqua dest.
10. Differenzieren in 96 % Alkohol und gleichzeitiges Auswaschen der überschüssigen Pikrinsäure
11. 2 x 96 % Alkohol, absoluter Alkohol, Xylol, eindeckeln

A: 0,5 g Fuchsin (kein Säurefuchsin), 1 g Resorcin werden in 50 ml aqua dest. gelöst

B: 20 g Eisenchlorid werden in 10 ml aqua dest.. gelöst

Lösung A zum Kochen bringen, Lösung B zugeben, bei kleiner Flamme unter Schwenken 5 min kochen lassen. Nach dem Erkalten auf Zimmertemperatur filtrieren. Niederschlag mit Filter in Erlenmeyerkolben und mit 70-100 ml 96 % Alkohol übergießen und

vorsichtig erhitzen, bis Niederschlag in Lösung geht. Nach Erkalten mit 1 ml off. Salzsäure versetzen und filtrieren.

Pikrinsäure-Thiazinrot: 100 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure und 5 ml einer 1 %igen wässrigen Lösung von Thiazinrot.

### **PAS-Reaktion nach Arnold**

1. Schnitte entparaffinieren bis aqua dest.
2. 10 min 0,5 % Perjodsäure
3. 10 min fließendes Wasser
4. 2 x 2 min aqua dest.
5. 30 min Schiffssches Reagenz bei 60 °C
6. 3 x 2min frisches Sulfitwasser
7. 10 min fließendes Wasser
8. 2 min aqua dest.
9. 3 min Kernfärbung Hämalan
10. 10 min wässern
11. aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln

Schiffssches Reagenz nach Graumann: 5 g P-Rosanilin, acridinfrei in 150 ml 1 N HCl lösen. Zugabe von 850 ml aqua dest. mit 5 g Kaliumdisulfit. Die Lösung wird innerhalb von 24 Stunden gelblich und wird dann 2 min lang mit 3 g Aktivkohle geschüttelt und anschließend 2 x filtriert (dann farblos).

Sulfitwasser: 3 Teile aqua dest., 1,5 Teile 10 % Kaliumdisulfit, 1,5 Teile 1 N HCl

### **Masson-Färbung**

1. 5 min Eisenhämatoxilin nach Weigert (4 Teile A, 3 Teile B)
2. kurz in Leitungswasser spülen
3. differenzieren in 1 % Essigsäure bis Bindegewebe fast farblos ist
4. 2 x 5min gründlich in aqua dest. auswaschen
5. 5 min rote Farbe (1 Teil C, 2 Teile D)
6. kurz in aqua dest. spülen
7. 5 min 1 % Phosphormolybdänsäure
8. 1,5 min 1 % Anilinblau
9. 2 x aqua dest., kurz abspülen

10. 5 min 1 % Essigsäure (kontrollieren wie Anilinblau gefärbt), auf Fliespapier geben

11. 3 x absoluter Alkohol

12. Xylol, eindeckeln

Beim Ansetzen der Farblösung Wasser zum Sieden bringen, Farbstoff hinzufügen, vom Feuer nehmen und Eisessig hinzugeben. Unter Verschluss erkalten lassen und filtrieren.

Anilinblau: 2,5 g Anilinblau, 100 ccm aqua dest., 2,5 ccm Eisessig

A: 0,5 g Fuchsin (kein Säurefuchsin), 1 g Resorcin werden in 50 ml aqua dest. gelöst

B: 20 g Eisenchlorid werden in 10 ml aqua dest. gelöst

C: 1 g Säurefuchsin, 100 ccm aqua dest., 1 ccm Eisessig

D: 1 g Ponceau de Xylidine, 100 ccm aqua dest., 1 ccm Eisessig

### **Goldner-Färbung**

(Modifikation der Massonschen Trichromfärbung nach Goldner)

1. 1-2 min Kernfärbung mit Weigertschem Eisenhämatoxin (4 Teile A, 3 Teile B)
2. 10 min auswaschen in fließendem Wasser
3. 5 min färben in Säurefuchsin-Ponceau, Azophloxin oder Ponceau-Fuchsin-Azophloxin (3 Teile Azophloxin, 1 Teil Säurefuchsin)
4. Abspülen in 1 %iger Essigsäure
5. 30 min differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange. Es ist wichtig, dass dabei das Bindegewebe vollständig entfärbt wird
6. Kurz abspülen in 1 %iger Essigsäure
7. 5 min Gegenfärbung mit Lichtgrün
8. 5 min auswaschen in 1 %iger Essigsäure
9. Absoluter Alkohol, 3x Xylol, eindeckeln

Ponceau S 0,2 g, Säurefuchsin 0,1 g, 300 ml aqua dest., 0,6 ml Eisessig

Azophloxin 0,5 g, 100 ml aqua dest., 0,2 ml Eisessig

Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin besteht aus 5-10 ml der Massonschen Ponceau-Säurefuchsinlösung, 2 ml der obigen Azophloxinlösung und 88 ml 0,2 % Essigsäure

Phosphormolybdänsäure (oder Phosphorwolframsäure) 3 g, 100 ml aqua dest.,  
1 g OrangeG

Lichtgrün 0,1 g, 100 ml aqua dest., 0,2 ml Eisessig

A: 0,5 g Fuchsin (kein Säurefuchsin), 1 g Resorcin werden in 50 ml aqua dest. gelöst

B: 20 g Eisenchlorid werden in 10 ml aqua dest. gelöst

**Azanfärbung nach Heidenhain**

1. Schnitte entparaffinieren bis aqua dest.
2. 30 min in Azokarmin im Wärmeschrank bei 60 °C (nicht filtrieren!)
3. Spülen in aqua dest.
4. 3 min alkoholische Anilinlösung (0,1 ccm Anilinöl + 100 ccm 96 % Alkohol)
5. 1 min essigsaurer Alkohol (1 ccm Eisessig + 100 ccm 96 % Alkohol)
6. 30 min 5 % wässrige Phosphorwolframsäure
7. kurz spülen in aqua dest.
8. Differenzieren in 96 % Alkohol
9. Xylol, eindeckeln in Kamuabalsam

Azokarminlösung: 0,1 g Azokarmin G in 100 ccm aqua dest. kurz aufkochen, abkühlen und mit 1 ccm Eisessig versetzen.

Anilinblau-Orange-Essigsäure: 0,5 g wasserlösliches Anilinblau, 2 g OrangeG, 100 ccm aqua dest. und 8 ccm Eisessig aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren. Als Gebrauchslösung 1:2 verdünnen.

**Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

(maschinelle Färbung)

1. 2 x 2 min Xylol-Ersatz (Roti-Histol®)
2. 2 x 2 min Isopropanol
3. 2 min + 1min Ethanol 96 %
4. 30 sec Ethanol 70 %
5. 4 min 5 % Ammoniaklösung (Kardasewitsch)
6. 4 min + 2 min aqua dest.
7. 4 min Hämatoxylin
8. 1 sec HCl-Alkohol
9. 5 min mit Leitungswasser wässern
10. 1,5 min Eosin
11. 1 min + 30 sec + 30 sec Ethanol 96 %
12. 2 x 30 sec Isopropanol
13. 3 x 30 sec Xylol-Ersatz

# Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Clauß für die Vergabe des Themas sowie für seine stets geleistete wissenschaftliche und praktische Unterstützung.

Ein Dank auch allen Technischen und Wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Tierphysiologie für die engagierte Unterstützung.

Den Herren Proff. E. Petzinger und R. Bauerfeind danke ich in Ihrer Funktion als Sprecher des Graduiertenkollegs Molekulare Veterinärmedizin für die Förderung dieses Projektes.

Ebenso möchte ich den Kollegiatinnen und Kollegiaten für die schöne gemeinsame Zeit danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein besonderer Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

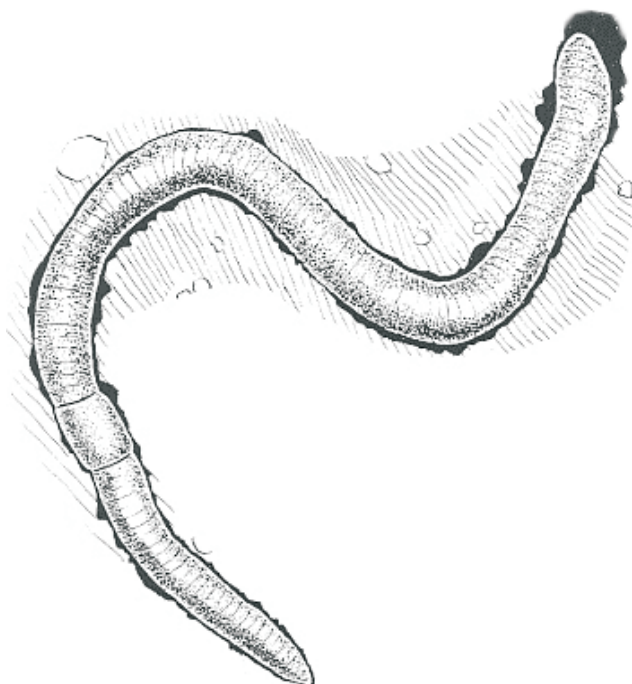
Ein spezieller Dank sei Herrn Dr. M. Hardt von der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit gesagt, der viel Zeit und Wissen in meine Studien investiert hat.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Veterinärpathologie und besonders Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt danke für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten.

Bei Herrn Prof. M. Diener und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Unterstützung bei den Radioisotopenuntersuchungen herzlich bedanken.

Und schließlich danke ich meinem Ehemann, meinen Eltern und meinen Freunden für ihre moralische und materielle Unterstützung.

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
Email: [vvb-ips@t-online.de](mailto:vvb-ips@t-online.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN 3-89687-480-2

